



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUCIANA PEREIRA BERND

***FUSARIUM VERTICILLIOIDES* E FUMONISINA NA CADEIA
PRODUTIVA DE MILHO:
MODELAGEM MATEMÁTICA E ESTRATÉGIA DE CONTROLE**

Londrina
2010

LUCIANA PEREIRA BERND

***FUSARIUM VERTICILLIOIDES* E FUMONISINA NA CADEIA
PRODUTIVA DE MILHO:
MODELAGEM MATEMÁTICA E ESTRATÉGIA DE CONTROLE**

Tese apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Ciência de Alimentos, nível Doutorado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka

Londrina
2010

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B524f Bernd, Luciana Pereira.

Fusarium verticillioides e fumonisina na cadeia produtiva de milho : modelagem matemática e estratégia de controle / Luciana Pereira Bernd. – Londrina, 2007.

213 f.: il

Orientador: Elisa Yoko Hirooka.

Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Milho – Armazenamento – Doenças e pragas – Teses. 2. Milho como alimento – Teses. 3. Agricultura – Modelos matemáticos – Teses. 4. Fusarium verticillioides – Teses. 5. Milho – Produtividade – Teses. I. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. II. Hirooka, Elisa Yoko. III. Título.

CDU 641:579

LUCIANA PEREIRA BERND

***FUSARIUM VERTICILLIOIDES* E FUMONISINA NA CADEIA
PRODUTIVA DE MILHO:
MODELAGEM MATEMÁTICA E ESTRATÉGIA DE CONTROLE**

Tese apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Ciência de Alimentos, nível Doutorado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Diva de Souza Andrade
IAPAR – Londrina - PR

Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate
UEPG – Ponta Grossa - PR

Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Fábio Yamashita
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka
UEL – Londrina – PR

Londrina, 29 de setembro de 2010.

À Deus, que me deu o dom da vida, presenteou-me com a liberdade, abençoou-me com a inteligência, e me deu a graça de lutar para a conquista de minhas realizações.

Aos meus pais Guilherme e Marion, e minha irmã Marina, pelo amor incondicional, cuja certeza é essencial em minha vida. Pelo incentivo, dedicação e apoio constante, estando sempre presente durante toda essa caminhada, eternamente grata;

Ao Pablo, por todo amor, apoio e dedicação nos momentos mais difíceis, pela compreensão e incentivo nos momentos de ausência.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka pela confiança, incentivo, oportunidades, exemplo de seriedade e orientação, proporcionando amadurecimento científico e profissional, 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) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas de doutorado concedidas e apoio financeiro.

À Fundação Araucária, FINEP, Fundo SETI, pelo apoio financeiro.

À Companhia Brasileira de Esterilização (CBE), pela disponibilidade em irradiar as amostras de milho e incentivar a pesquisa brasileira.

À Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono, pelas sugestões no exame de qualificação, pelas elucidações de dúvidas e incansável disposição para correção de artigos que compõe esta tese, meu eterno agradecimento.

Ao Departamento de Bioquímica (Centro de Ciências Exatas) da Universidade Estadual de Londrina, pela permissão do uso do laboratório de Bioquímica.

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

Ao professor Fábio Yamashita, pelas sugestões no exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Claudemir Zucarelli, pela confiança e oportunidade de inserção em seus projetos de pesquisa e valiosas sugestões a artigos que compõem esta tese.

Ao André Mateus e Mariana A. de Oliveira, pelo auxílio na elucidação de dúvidas e confiança em ceder as amostras de seus projetos de pesquisa.

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, pela colaboração.

Ao técnico do laboratório de Bioquímica, Nelson J. Rodriguez, pelo auxílio e colaboração.

À Sandra Rezende, Elza, Berenice, Maria Alice, Alessandra, Célia e, principalmente, à Patrícia Sambatti, por todo o auxílio, disposição e colaboração.

À Daniele Sartori, pelo auxílio e colaboração em um dos artigos que compõe a tese.

Aos alunos Diogo G. Pedrollo, Renata P. Sobottka e Suzy S. S. Kurokawa, pelo auxílio como estagiários.

Aos amigos Angélica T. Ishikawa e Thiago M. Souza, pela colaboração como estagiários, incansável dedicação durante a realização deste trabalho, amizade e momentos de descontração e alegria juntos, tornando os dias mais felizes e prazerosos.

Aos meus eternos amigos Cleusa Weber e Denis F. Marchi, pela força e alegria em todos os momentos.

Aos amigos e colegas Dani Luce D. da Silva, Cássia R. Tabakayashi, Cleiton I. Ramos, Joice S. dos Santos, Tatiana de A. Miguel, Tatiane M. de Oliveira, Luciana V. H. Ferreira, Aline F. de Souza, Carolina N. Rossi, pela alegria, companheirismo e momentos de descontração, tornando mais suaves os dias mais difíceis.

Aos meus amados pais, Guilherme e Marion, por todo carinho, exemplo, dedicação e esforços realizados para minha realização profissional.

À minha amada irmã, por compartilhar dos meus ideais, pelo amor, motivação e amizade; e aos meus avós, Valdir e Telma e, em especial, a quem partiu ao longo dessa caminhada deixando saudade, minha avó Josefina (*in memoriam*), em nome de tudo o que representam para mim, pelas preces, amor e incentivo.

À minha cunhada Gisele, pelo carinho, incentivo, amizade e disponibilidade de hospedagem em Curitiba.

Ao Pablo T. Della Cruz, que fez de meus sonhos seus próprios objetivos, pelo amor, incentivo constante, companheirismo, paciência, atitude de segurança e felicidade proporcionada desde o início do doutorado, mesmo nos momentos distantes.

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

**“Investir em conhecimento rende
sempre os melhores juros”.**

(Benjamin Franklin)

BERND, LUCIANA P. *Fusarium verticillioides* e fumonisina na cadeia produtiva de milho: modelagem matemática e estratégia de controle. 2010. 213 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

O Estado do Paraná ocupa posição estratégica pela liderança nacional na produção de milho, na qual se deve garantir a segurança fitossanitária. *Fusarium verticillioides* encontra-se frequentemente associado ao milho e é o principal produtor de fumonisinas, um grupo de micotoxinas que representa riscos à saúde humana e animal. O trabalho teve por objetivo desenvolver modelos matemáticos para descrever o efeito de umidade, temperatura e concentração de inóculo de *F. verticillioides* no crescimento fúngico e produção de fumonisinas em milho, bem como avaliar a produção da toxina frente a mudanças drásticas de temperatura ao longo de incubação e mediante análise de cinética, acompanhar alterações químicas, micológicas e produção de fumonisina nos grãos. Além disso, em condições de campo, verificar o efeito de práticas culturais e inoculação das sementes com *Pseudomonas fluorescens* como estratégias de controle na contaminação fúngica e por fumonisinas e suas alterações em características químicas de grãos de milho. Após avaliação de toxigenicidade de cepas de *F. verticillioides* (103F, 113F, 119B, 119BR e 97K) submetidas a constantes repicagens desde o isolamento (1991 a 2007) e validação de modelos matemáticos para produção de fumonisinas, mudanças drásticas de temperatura (0, 5 e 40 °C) foram aplicadas em diferentes estágios de incubação sob condições ótimas (25 % umidade; 20 °C). Posteriormente, executou-se um delineamento fatorial 24 visando avaliação de melhor condição para produção de fumonisinas e crescimento fúngico em função do híbrido de milho (Tork e P30F53), cepa de *F. verticillioides* com diferentes datas de repique (103F – A e B), composição de meios de cultura (BDA) utilizados para crescimento da cepa (A e B) e substrato submetido ou não a tratamento térmico (121 °C/20 min). Mediante condições definidas, procedeu-se com planejamento central composto utilizando-se dois híbridos de milho (Tork e P30F53), onde, por meio de modelos matemáticos, avaliou-se o efeito de umidade ajustada dos grãos 15-30 %, concentração de inóculo de *F. verticillioides* (103-107 propágulos mL⁻¹) e temperatura de incubação 15-30 °C, durante 20 dias, na produção de fumonisinas e contagem fúngica. Sob níveis (15-27 % de umidade, 103-107 propágulos *F. verticillioides* mL⁻¹ e 18-27 °C) que apresentaram elevada, intermediária e baixa produção de fumonisina, realizou-se cinética a cada 2 dias, durante 20 dias, onde se avaliou a produção da toxina, contagem de *F. verticillioides*, teores de proteína e lipídeos dos grãos de milho (híbrido P30F53). Em condições de campo (segunda safra 2009), realizou-se planejamento fatorial 4x4 com quatro populações de plantas (40, 60, 80 e 100 mil plantas ha⁻¹) e quatro doses de nitrogênio em cobertura (0, 50, 100 e 150 Kg ha⁻¹), procedendo-se quantificação de fumonisinas e avaliação de características físico-químicas de grãos de milho do híbrido AG 9010 YG. Na mesma safra, utilizou-se arranjo fatorial 3x2, correspondente a três níveis de adubação NPK no sulco de semeadura (0, 125 e 250 kg ha⁻¹) e dois de inoculante a base de *P. fluorescens* (com e sem), a fim de avaliar a influência na composição química e na contaminação fúngica e por fumonisinas em grãos do híbrido P30F35. Das cepas de *F. verticillioides* avaliadas frente à manutenção da toxigenicidade, 90 % e 85 % produziram FB1 (0,28 - 2610,65 µg g⁻¹) e FB2 (0,03 - 781,07 µg g⁻¹), respectivamente. Mediante inoculação de *F. verticillioides* (cepa 103F) em grãos de milho (25 % umidade/ 20 °C), choques térmicos no início da incubação mostraram-se ineficazes no aumento de produção de fumonisinas, porém elevação foi observada quando se aplicou 40 °C após duas semanas. Composição do

meio de cultura e as cepas de *F. verticillioides* com diferentes datas de repique não apresentaram influência significativa no crescimento fúngico e produção de fumonisinas, porém o tratamento térmico (121 °C/20 min) resultou em aumentos significativos destes, sendo mais evidenciado no híbrido Tork. O conteúdo de umidade exerceu maior efeito na contagem de *F. verticillioides*, porém a temperatura mostrou maior influência na produção de fumonisina. Mediante cinética, a produção de fumonisinas foi intensificada após o 10º dia de incubação e, no seu início, houve redução dos teores de proteína e lipídeos, com elevação deste último ao longo da incubação. Sob condições de campo, a contaminação por fumonisinas não teve correlação significativa com a dose de nitrogênio em cobertura, densidade de plantas, níveis de adubação NPK e inoculação com *P. fluorescens*. No entanto, alterações físico-químicas foram observadas nos grãos devido ao manejo. Modelos matemáticos podem ser ferramentas úteis no entendimento da dinâmica da produção de fumonisinas em milho, onde aliados a práticas de manejo, podem representar estratégias para minimizar risco de contaminação deste cereal.

Palavras-chave: *Zea mays*. Fumonisina. *Fusarium verticillioides*. Modelagem matemática. Manejo de cultura.

BERND, LUCIANA P. *Fusarium verticillioides* and fumonisin in corn production chain: mathematical modeling and control strategy. 2010. 213 p. Thesis (Doctor Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

The Paraná State occupies a strategic position being the largest corn producer in Brazil, requiring phytosanitary security. *Fusarium verticillioides* is frequently associated with corn and is the main producer of fumonisin, a mycotoxin that causes diseases in human and animals. The study aimed to develop mathematical models to describe the effect of moisture content, temperature and *F. verticillioides* inoculum concentration on fungal growth and fumonisin production in corn, as well as evaluating the toxin production under drastic temperature changes during incubation. By means of kinetic analysis, evaluation of chemical changes, fungal growth and fumonisin production in grains was made. Furthermore, under field conditions, evaluation of the cultural practices and *Pseudomonas fluorescens* inoculation effect in fungal contamination / fumonisins and chemical changes of corn grains was also made. After evaluation of toxigenicity of *F. verticillioides* strains (103F, 113F, 119B, 119BR and 97K) subjected to constant subcultures (1991 to 2007) and mathematical /statistical validation of fumonisins production models, drastic temperature changes (0, 5 and 40 °C) were applied at different stages of incubation under optimal conditions (25% moisture, 20 °C). After, a 2⁴ factorial design aiming to evaluate optimum conditions for fumonisins production and fungal growth on the basis of hybrid maize (Tork and P30F53), *F. verticillioides* strain with different dates of replating (103F - A and B), different culture media composition (PDA) used for strain growth (A and B) and substrate subjected or not to heat treatment (121 °C/20 min). Under conditions defined, we proceeded with central composite design using two corn hybrids (Tork and P30F53), where, by mathematical models, the effect of moisture content 15-30 %, inoculum *F. verticillioides* concentration (10³-10⁷ propagules mL⁻¹) and incubation temperature 15-30 °C, during 20 days, on fungal count and fumonisin production was evaluated. Under levels (15-27 % moisture, *F. verticillioides* 10³-10⁷ propagules mL⁻¹ and 18-27 °C) which showed high, intermediate and low fumonisin production, the toxin production, *F. verticillioides* count, protein/ lipids levels of P30F53 corn hybrid, each 2 days, during 20 days was evaluated. Under field conditions (second 2009 crop), we proceeded a 4x4 factorial design, using four plant densities (40, 60, 80 and 100 000 plants ha⁻¹) and four rates of nitrogen in coverage (0, 50, 100 and 150 kg ha⁻¹), proceeding fumonisins quantification and evaluation of physical/ chemical characteristics of corn hybrid AG 9010 YG. In the same crop, a 3x2 factorial design was used, corresponding to three NPK fertilization levels (0, 125 and 250 kg ha⁻¹) and two inoculation-based *P. fluorescens* (with and without), to evaluate the influence on the chemical composition and fungal/ fumonisin contamination in grain hybrid P30F35. *F. verticillioides* strains which was evaluated for the maintenance of toxigenicity, 90 % and 85 % produced FB₁ (0.28 – 2610.65 µg g⁻¹) and FB₂ (0.03 – 781.07 µg g⁻¹), respectively. Thermal shock applied at initial-incubation was ineffective on fumonisin production regardless of sudden temperature-shock applied. However, an increasing toxin-peak was observed, if 40 °C-shock was applied after two weeks. Marks of culture medium and *F. verticillioides* strains with different replating dates showed no significant influence on fungal growth and fumonisin production, but the heat treatment (121 °C/20 min) provided significant increases of these, mainly in the hybrid Tork. The moisture content exerted a greater effect on *F. verticillioides* count, but the temperature affected more in the fumonisin production. By kinetic analysis, the fumonisin production was

enhanced after 10th day of incubation. Protein and lipids levels decreased at the beginning of incubation, with increase of lipids levels up to 20th day. Under field conditions, the fumonisins contamination did not correlated significantly with dose of nitrogen, plant density, levels of NPK fertilization and inoculation with *P. fluorescens*. However, physicochemical alterations were observed in grains produced with different management practices. Mathematical models can be useful tools in understanding the dynamics of the fumonisins production in corn, where allied to management practices, may represent strategies to minimize risk of contamination of this cereal.

Keywords: *Zea mays*. Fumonisin. *Fusarium verticillioides*. Mathematical modeling. Crop management.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura química dos principais análogos de fumonisinas.....	30
Figura 2 –	Mecanismo de ação da fumonisina B1 em relação à síntese de esfingolípídeos.....	31
Figura 3 –	Via Metabólica das Policetidas.....	34
Figura 4 –	Procedimento operacional para validação de modelagem matemática para definição de condições ótimas para produção de fumonisina	51
Figura 5 –	Procedimento operacional de simulação de choque drástico de temperatura	52
Figura 6 –	Fluxograma operacional do teste de toxigenicidade de cepas de <i>F. verticillioides</i>	53
Figura 7 –	Procedimento operacional de fatores bióticos e abióticos na produção de fumonisina e crescimento de <i>F. verticillioides</i>	54
Figura 8 –	Procedimento operacional para definição de condições críticas para produção de fumonisina e crescimento de <i>F. verticillioides</i>	55
Figura 9 –	Procedimento operacional de cinética de produção de fumonisina, contagem fúngica e modificações de lipídeos e proteínas nos grãos de milho	56
Figura 10 –	Procedimento operacional de densidade de plantas e doses de nitrogênio na cultura do milho na contaminação por fumonisinas e características físico-químicas dos grãos.....	57
Figura 11 –	Procedimento operacional de inoculação a base de <i>Pseudomonas fluorescens</i> e adubação NPK nas características químicas, contaminação fúngica e por fumonisinas em grãos de milho.....	58
Figura 12 –	Extração e purificação de fumonisinas.....	59
Figura 13 –	Quantificação de fumonisina por CLAE	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fungos micotoxígenos e respectivas micotoxinas.....	23
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo Geral	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	Milho	20
3.2	Contaminação Fúngica e Micotoxinas	22
3.2.1	Fatores que Interferem no Crescimento Fúngico e Produção de Micotoxinas	24
3.2.2	<i>Fusarium verticillioides</i>	27
3.2.3	Fumonisinias	29
3.3	Deteção e Quantificação De Fumonisinias	35
3.4	Estratégias de Controle e Minimização da Ocorrência de <i>Fusarium verticillioides</i> e de Fumonisinias em Milho	37
3.4.1	Manejo da Cultura	38
3.4.1.1	Fertilização do solo	38
3.4.1.2	Densidade de plantas e espaçamento entre linhas	42
3.4.2	Utilização de Rizobactérias	44
3.5	Modelos Matemáticos Preditivos para Fungos Micotoxígenos	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	Material	49
4.1.1	Infra-estrutura	49
4.1.2	Matéria-prima	49
4.1.3	<i>Fusarium verticillioides</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i>	50
4.2	Métodos	50
4.2.1	Delineamento Experimental	51
4.2.1.1	Validação de Modelagem Matemática para Definição de Condições Ótimas para Produção de Fumonisinias	51
4.2.1.2	Simulação de Choque Drástico de Temperatura na Contagem Fúngica e Produção de Fumonisinina	52

4.2.1.3	Avaliação de Toxigenicidade de Cepas de <i>F. verticillioides</i> com Datas de Repique entre 1991 a 2007	53
4.2.1.4	Fatores Bióticos e Abióticos na Produção de Fumonisina e Crescimento de <i>F. verticillioides</i>	54
4.2.1.5	Definição de Condições Críticas para Produção de Fumonisina e Crescimento de <i>F. verticillioides</i>	55
4.2.1.6	Cinética de Produção de Fumonisina, Contagem Fúngica e Modificações de Lipídeos/ proteínas nos Grãos	56
4.2.1.7	Influência da Densidade de Plantas e Doses de Nitrogênio na Cultura do Milho na Contaminação por Fumonisinas e nas Características Físico-químicas dos Grãos.....	57
4.2.1.8	Influência da Inoculação a Base de <i>Pseudomonas fluorescens</i> e Adubação NPK nas Características Químicas, Contaminação Fúngica e por Fumonisinas em Grãos de Milho.....	58
4.2.1.9	Extração e Purificação de Fumonisinas.....	59
4.2.1.10	Quantificação de Fumonisina por CLAE	60
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1	Validated modelling in reliable experimental design to study the effect of temperatureshock in fumonisin production in corn.....	62
5.2	Manutenção laboratorial na produção de fumonisina por <i>Fusarium verticillioides</i> isolado de intoxicação animal.....	89
5.3	Efeito de Fatores bióticos e abióticos na produção de fumonisina e no crescimento de <i>Fusarium verticillioides</i>	103
5.4	Fumonisin production and <i>Fusarium verticillioides</i> count as a function of moisture content, temperature and inoculum on corn grain of two hybrids.....	121
5.5	Kinetics of fumonisin production, <i>Fusarium verticillioides</i> count and lipids /proteins changes under in vitro conditions on corn grains.....	140
5.6	Efeito da Densidade de plantas e doses de nitrogênio na cultura do milho na contaminação por fumonisinas e nas características físico-químicas dos grãos	157
5.7	Efeito da Inoculação a base de <i>Pseudomonas fluorescens</i> e adubação NPK nas características químicas, contaminação por fungos e fumonisinas em grãos de milho.....	174

6	CONCLUSÃO.....	195
7	PUBLICAÇÃO E TRABALHOS CIENTÍFICOS.....	197
8	REFERÊNCIAS	198

1 INTRODUÇÃO

A agropecuária constitui a base da economia brasileira, garantindo o fornecimento contínuo de matéria-prima de origem vegetal e animal, sendo o cenário mundial atual favorável à consolidação do país como grande exportador. Em 2009/2010, a produção brasileira total de grãos é estimada em 143,95 milhões de toneladas, sendo que a safra de milho deve alcançar a produção de 51,3 milhões de toneladas. No cenário, o Estado do Paraná ocupa posição estratégica pela maior produção de grãos, tendo destaque o milho, com uma estimativa de produção de 11,5 milhões de toneladas para a safra 2009/2010 (CONAB, 2010).

A qualidade do milho é afetada por uma série de fatores tais como a própria cultivar, solo, fertilização, clima, práticas culturais, pragas e contaminações por microrganismos. Desta forma, torna-se importante e necessário o desenvolvimento de estudos na tentativa de solucionar os vários problemas que envolvem esses fatores, buscando a obtenção de altas produções aliada à elevada qualidade.

As propriedades nutricionais do milho o enquadraram como constituinte principal de ração animal com 60 % da sua composição e como base alimentar em diversos países. Não obstante, este fato torna-o também o alvo vulnerável de deterioração fúngica, com possibilidade de produção de micotoxinas; aliado à condição climática tropical- subtropical predominante no Brasil (temperatura e umidade), que também favorece o desenvolvimento de fungos.

A alteração na qualidade do milho atribuída à contaminação fúngica e produção de micotoxinas pode ocorrer em qualquer etapa da cadeia produtiva, sendo que os fatores que mais interferem estão relacionados com condições climáticas de cultivo, colheita e armazenagem, gerando perdas no rendimento agrícola, valor nutricional e qualidade sanitária. Conseqüentemente, todos os segmentos da cadeia produtiva devem ser direcionados para a produção de alimento com qualidade, sendo este também o fator determinante na competitividade perante o mercado internacional. Uma vez contaminados, as micotoxinas persistem em alimentos e ração devido à elevada estabilidade molecular, resistindo a processos físico-químicos comuns no processamento alimentar. O monitoramento adequado de micotoxinas envolvendo desde a etapa de plantio no campo, aliado às medidas preventivas, é essencial para garantir a segurança de produtos e subprodutos agropecuários comercializados.

Dentre os fungos micotoxigênicos envolvidos na cadeia produtiva do milho destacam-se os gêneros *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp., responsáveis pela produção das principais micotoxinas de interesse agro-alimentar. Dentre o gênero *Fusarium* spp., a espécie *F. verticillioides* é responsável pela podridão da raiz, colmo, espiga e deterioração de grãos de milho armazenados, ou seja, causadora de doença em todas as fases de desenvolvimento do milho, cuja predominância de infecção assintomática resulta disseminação na planta. Além disto, o *F. verticillioides* produz fumonisinas, micotoxinas capazes de desencadear intoxicação aguda em animais e classificadas pelo “International Agency for Research on Cancer” como carcinógenas do grupo 2B, isto é, possíveis carcinógenas humanas.

Neste contexto, a utilização de modelos matemáticos representa um procedimento prático na descrição de crescimento microbiano e produção de metabólitos secundários sob condições específicas, sendo muito útil também na predição de risco. Aliado a isto, a utilização de híbridos de milho que apresentem maior potencial produtivo e maior resistência a situações de estresse, o fornecimento adequado de nutrientes para a cultura, a escolha do arranjo espacial e a utilização de biocontrole são alternativas que podem incrementar a produtividade, alterar as características químicas e micológicas do grão, a ocorrência e a intensidade das doenças, e conseqüentemente, afetar a qualidade do produto.

O trabalho pretende contribuir com a minimização da contaminação de milho por *F. verticillioides* e produção de fumonisina, realizando cinética para melhor entendimento da dinâmica de produção dessa micotoxina e propondo modelos matemáticos que elucidem o efeito da umidade e da temperatura, e estabeleçam seus níveis prioritários na pós-colheita. Aliado a isto, os efeitos de populações de plantas, doses de adubação e utilização de biocontrole, em condições de campo, foram avaliados como estratégias de controle frente contaminação fúngica e por fumonisinas em grãos de milho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver modelos matemáticos para descrever o efeito de umidade, temperatura e concentração de inóculo de *Fusarium verticillioides* no crescimento fúngico e produção de fumonisinas em milho, bem como, avaliar a produção da toxina frente a mudanças drásticas de temperatura ao longo da incubação. Mediante análise de cinética, acompanhar alterações químicas, micológicas e produção de fumonisina nos grãos. Além disso, em condições de campo, verificar o efeito de práticas culturais e inoculação com *Pseudomonas fluorescens* como estratégias de controle na contaminação fúngica/ fumonisinas e alterações nas características químicas de grãos de milho.

2.2 Objetivos Específicos

- Validação matemática/ estatística e gráfica de modelos desenvolvidos para contagem de *F. verticillioides* e outros fungos contaminantes predominantes no milho, bem como para o teor de fumonisinas, visando estabelecer os níveis dos parâmetros prioritários (temperatura e umidade) a serem controlados na etapa antecedente à secagem;
- Inserir mudanças drásticas de temperatura ao longo de incubação sob condições ótimas para produção de fumonisinas pré-estabelecidas pelos modelos;
- Determinar a produção de fumonisinas por diferentes cepas de *F. verticillioides* isoladas em 1991 de ração animal e que sofreram sucessivos subcultivos até o ano de 2007;
- Avaliar a influência de fatores bióticos e abióticos no crescimento de *F. verticillioides* e produção de fumonisinas;
- Avaliar o efeito e estabelecer pontos críticos de umidade, temperatura e concentração de inóculo de *F. verticillioides* no crescimento fúngico e produção de fumonisinas, mediante modelagem matemática;
- Estudar a cinética de produção de fumonisinas e contagem de *F. verticillioides* frente a alterações químicas em grãos de milho;

- Avaliar em condições de campo:

- O efeito de populações de plantas e doses de adubação nitrogenada em cobertura, sobre a produção de fumonisinas e características físico-químicas de grãos de milho em sistema de semeadura direta;

- O efeito promovido pela inoculação de *Pseudomonas fluorescens* na cultura do milho sob diferentes níveis de adubação NPK na produção de fumonisinas, na contaminação fúngica e na composição química dos grãos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Milho

O milho (*Zea mays* L.), que é uma monocotiledônea pertencente à família Gramíneae, teve origem nas Américas, possivelmente no México, América Central ou Sudoeste dos Estados Unidos. Logo depois do descobrimento, foi levado para a Europa e cultivado em jardins até que seu valor alimentício se tornasse conhecido. Desde então passou a ser plantado em escala comercial e difundiu-se pelo mundo desde a latitude de 58° norte (União Soviética) até 40° sul (Argentina) (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000).

Classificado entre cereais de extrema importância na alimentação humana e animal, apresenta alta eficiência na produção de alimentos com qualidade nutricional, justificando a sua introdução como ingrediente nos mais diversos produtos derivados. A elevada concentração de carboidratos (70 % de amido), confere ao milho um elevado valor energético (1660 kJ 100g⁻¹), além de conter 10 % de proteína e 4,5 % de lipídeo, minerais e vitaminas. Através da refinação e processamento obtêm-se dextrinas, óleos para fins alimentares e industriais, além de glicose líquida e sólida. 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 como a lisina e triptofano, limitando o valor nutricional (TOSELLO, 1999).

O milho representa 15 a 20 % da dieta diária em mais de 20 países em desenvolvimento, suprimindo a necessidade nutricional da população, principalmente na América Latina e África (CIMMYT, 2009). 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, complementando aproximadamente 70 % da necessidade protéica humana (TOSELLO, 1999).

No entanto, o uso do milho para alimentação animal representa a maior parte do consumo desse cereal, isto é, cerca de 70 % no mundo. Nos Estados Unidos, cerca de 50 % é

destinado a esse fim, enquanto que no Brasil, de todo o milho produzido, cerca de 82 % é consumido sob a forma de ração (ABIMILHO, 2010).

Devido à qualidade nutricional, facilidade de adaptação e aplicabilidade, o milho constitui um cereal de importância econômica mundial. A produção anual média é de aproximadamente 700 milhões de toneladas, sendo o maior produtor mundial os Estados Unidos, seguido da China e Brasil. Em 2009, estes países produziram 333,0; 155,0 e 53,5 milhões de toneladas, respectivamente (USDA, 2010). Segundo a CONAB (2010), a produção brasileira total de grãos na safra 2009/2010 é estimada em 143,95 milhões de toneladas, sendo que a safra de milho deve alcançar a produção de 51,3 milhões de toneladas, o que representa um aumento de 6,2 % em relação à safra 2008/2009. No cenário, o Estado do Paraná ocupa posição estratégica pela maior produção de milho, com uma estimativa de produção de 12,6 milhões de toneladas para a atual safra.

As altas produtividades no milho têm sido garantidas pela adaptação de cultivares às mais variadas situações de clima e solo, pelo melhoramento genético, pela melhoria de propriedades químicas, físicas e biológicas dos solos cultivados, além de adoção de práticas culturais, tais como a utilização de quantidades substanciais de fertilizantes nitrogenados e a manipulação do arranjo espacial de plantas (DUARTE *et al.*, 2006).

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; MEREDITH; VOSS, 2001; 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.

A presença de microrganismos nos grãos de milho, em especial de fungos toxigênicos, acarreta perdas econômicas e riscos à saúde humana e animal, uma vez que metabólitos tóxicos podem ser produzidos. No Brasil, os principais fungos encontrados no milho são *Fusarium* spp. e *Cephalosporium* spp. em campo, e *Aspergillus* spp. e *Penicillium*

spp., em condições de armazenamento (SWEENEY; DOBSON, 1998; MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997; WEIDENBÖRNER, 2001).

3.2 Contaminação Fúngica e Micotoxinas

Os fungos são organismos eucarióticos, 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 filamentosos produzem uma imensa diversidade de metabólitos secundários constituídos de pigmentos, antibióticos, fitotoxinas, além de micotoxinas. Quando produzidos em associação com os alimentos, ração animal e forragens, estes metabólitos tóxicos ingeridos pelo homem e animais, provocam as micotoxicoses (MOSS, 2002).

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 toxigênicos inicia-se no campo durante o desenvolvimento, maturação e colheita, com o incremento no transporte, moega, secagem e armazenamento, quando as condições são favoráveis (LAZZARI; LAZZARI, 2000).

As principais espécies toxigênicas 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)

O grão de milho pode sofrer grandes perdas e variações em sua qualidade e quantidade devido à contaminação fúngica, presença de micotoxinas, infestação de insetos e ácaros, tipo de híbrido e condições climáticas. Estas perdas podem ocorrer antes e após a maturação fisiológica do grão, ainda no campo. A maturação fisiológica do milho, i.e., o máximo de sua qualidade e de seu peso em matéria seca, ocorre quando o grão encontra-se numa faixa de umidade entre 36-40 %, dependendo do tipo de híbrido, localização geográfica, clima e outros fatores associados ao desenvolvimento. A partir deste ponto, começam a ocorrer perdas qualitativas e quantitativas, principalmente devido a problemas com micotoxinas (LAZZARI; LAZZARI, 2001).

O milho recém colhido apresenta-se úmido, e a demora na secagem pode desencadear produção de micotoxinas, reduzindo a qualidade geral do lote. A situação agrava-se com colheita sob condições úmidas, que normalmente interrompe a colheita devido às chuvas, ventos fortes, que causam a queda das plantas, retenção do caminhão carregado, filas e espera para descarga, demora na secagem e conseqüente armazenamento inadequado.

Chuvas e oscilações de temperatura fornecem as condições ideais para o crescimento de *Fusarium* spp. em milho seco no campo ou amontoado para ser trilhado. Estas práticas, comuns em pequenas propriedades, favorecem o processo de infecção, deterioração fúngica, produção de micotoxinas, e conseqüentemente, a degradação da qualidade do produto (LAZZARI, 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. Além disto, Placinta, D'Mello e Macdonald (1999) descreveram contaminação múltipla de cereais e ração animal por tricotecenos, zearalenona e fumonisinas, indicando co-ocorrência das principais micotoxinas de *Fusarium* spp.

As micotoxinas vêm merecendo considerável atenção desde a criação animal a aspectos relacionados à saúde pública (MALLMANN, 1998). A sua contaminação gera prejuízos financeiros decorrentes de baixa qualidade, predominantemente de grãos, baixa performance animal, limitando as exportações devido às restrições impostas pelos países importadores.

Em decorrência dos esforços da comunidade científica internacional, enunciadas 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).

3.2.1. Fatores que Interferem no Crescimento Fúngico e 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, atividade de água e temperatura) e o ataque de insetos nas imediações da colheita (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997).

Entre os fatores listados, a atividade de água constitui o principal determinante do crescimento fúngico e, conseqüente deterioração de alimentos (CAHAGNIER; MELCION; RICHARD-MOLARD, 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 grãos de milho (BRASIL, 1989).

O requerimento de água divide os fungos contaminantes nos grãos em grupos ecológicos (CHRISTENSEN; SAUER, 1982). 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*. Já os fungos de armazenagem, requerem teor de umidade na faixa de 16 % para a invasão micelial e, compreendem as espécies pertencentes aos gêneros *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; Wilson e McMillian (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 e Payne (1984) indicaram que a situação não é tão definida como sugerem os esquemas de classificação de fungos em três categorias: campo, armazenagem 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 toxicidade 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 danificar a camada do revestimento do grão, permitindo a invasão de micélios fúngicos. Além disto, os danos mecânicos e térmicos, resultantes do processo de colheita, transporte, secagem e armazenagem removem a proteção externa natural do grão. A falta de regulação 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 conseqüentemente a produção de micotoxinas (MARÍN *et al.*, 1998a,b; DOKO *et al.*, 1996). As espécies de *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* podem competir por nutrientes em condições ambientais (FANDOHAN; HELL; MARASAS, 2003). A competição pode ocorrer também entre espécies do mesmo gênero, sendo que populações de *F. proliferatum* e *F. verticillioides* foram reduzidos por *F. graminearum* em temperaturas de 15 °C e 25 °C e atividade de água 0,98, 0,95 e 0,93 (VELLUTI *et al.*, 2000).

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 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).

No armazenamento de grãos, 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, lipídeos, vitaminas, minerais e aminoácidos (MALLMANN, 1998).

3.2.2 *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. O patógeno também pode ser encontrado em arroz, cana-de-açúcar, banana, algodão e aspargo (SAMSON; HOEKSTRA; FRISVAD, 2004).

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; TOUSSOUN; MARASAS, 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).

Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg (anteriormente conhecido como *Fusarium moniliforme* Sheldon), pertence à seção Liseola, Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales, Família Nectriaceae (INDEX FUNGORUM, 2010). A fase teleomórfica é *Gibberella moniliformis* Winel. (SAMSON; HOEKSTRA; FRISVAD, 2004).

A espécie apresenta crescimento rápido (colônia com diâmetro superior a 2,0 cm em Ágar Batata Dextrose incubado por 3 dias a 25 °C, micélio aveludado e difuso, com pigmentação esbranquiçada a violeta escura (VENTURA, 2000; SAMSON; HOEKSTRA; FRISVAD, 2004). A esporulação e a pigmentação são favorecidas pela luz, incluindo os comprimentos de onda ultra-violeta e próximo ao ultra-violeta (VENTURA, 1999).

A infecção por *F. verticillioides* 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, esta espécie 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 infecção assintomática pode existir em toda a planta, em folhas, caules, raízes, sendo a presença do fungo em grãos de milho muitas vezes ignorada, pelo fato dos danos não serem visíveis (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997).

As condições de temperatura e umidade durante o período de desenvolvimento da planta, bem como durante o período de armazenamento são frequentemente apontados na infecção por patógenos e produção de micotoxinas (FANDOCHAN; HELL; MARASAS, 2003). A faixa de temperatura ótima para o crescimento de *F. verticillioides* situa-se 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).

Sob condições laboratoriais, altas concentrações de fumonsinas podem ser obtidas inoculando-se *F. verticillioides* em grãos de milho estéreis sob alta umidade. A quantidade de fumonisina é dependente da cepa empregada no cultivo (NELSON *et al.*, 1991; TSENG *et al.*, 1995; VISCONTI; DOKO, 1994). Vale ressaltar a importância de iniciar-se a cultura com conídio monoespórico e da conservação da viabilidade e das características morfológicas e fisiológicas do microrganismo. Os fungos filamentosos em cultivo sob constante repicagem apresentam uma elevada tendência para a mudança espontânea, seja morfológica (setorização, por exemplo) ou fisiológica (produção de metabólitos secundários), provavelmente relacionada às condições de cultura, aliado ao número de gerações (SANTOS *et al.*, 2002).

3.2.3 Fumonisinias

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

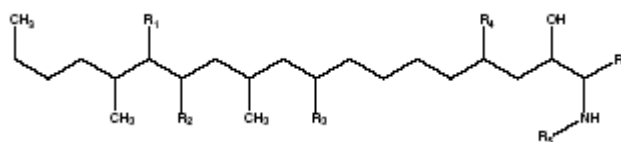
As fumonisinias B₁ (FB₁) e B₂ (FB₂) foram isoladas de culturas de *Fusarium verticillioides* MRC 826 por Gelderblom; Sample e Marasas (1988). Vinte anos de investigação na possível causa para a elevada incidência de câncer esofágico na região de Transkei (África do Sul) culminaram com esta descoberta (NELSON; DESJARDINS; PLATTNER, 1993).

A elucidação da estrutura química da fumonisina foi realizada por Bezuidenhout *et al.* (1988). Os 28 análogos de fumonisinias caracterizados até o momento podem ser separados em quatro grupos, denominados de fumonisinias das séries A, B, C e P (MUSSER; PLATTNER, 1997; RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002). As toxinas da série B (FB₁, FB₂ e FB₃) compreendem as fumonisinias toxicologicamente importantes, por constituírem os contaminantes naturais de milho, sendo que a FB₁ representa 70 % do total de fumonisinias detectadas, enquanto fumonisinias B₂ (FB₂) e B₃ (FB₃) constituem de 15 a 25 % e 3 a 8 % do total produzido, respectivamente (MARASAS, 1996; RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002).

Conforme mostrado na Figura 1, as fumonisinias são diésteres de propano-1,2,3-ácido tricarbóxico e 2-amino-12,16-dimetilpoliidroxieicosanos, com o grupo hidroxila no C₁₄ e C₁₅ esterificados com o grupo carboxila terminal do ácido tricarbóxico (SORIANO; DRAGACCI, 2004).

Este amino-poliálcool é um composto tricarbóxilado (TCA) altamente polar, solúvel em água, acetonitrila/ água e em metanol, insolúvel em solventes apolares, com ponto de fusão aproximado 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 ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
FB ₁	TCA	TCA	OH	OH	H	CH ₃
FB ₂	TCA	TCA	H	OH	H	CH ₃
FB ₃	TCA	TCA	OH	H	H	CH ₃
FB ₄	TCA	TCA	H	H	H	CH ₃
FC ₁	TCA	TCA	OH	OH	H	H
FC ₂	TCA	TCA	H	OH	H	H
FC ₃	TCA	TCA	OH	H	H	H
FC ₄	TCA	TCA	H	H	H	H
AP ₁	OH	OH	OH	OH	H	CH ₃

*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, de forma competitiva, a esfingosina *N*-acetil transferase (ceramida sintetase), uma enzima da síntese de esfingolípídeos. Portanto, a fumonisina B₁ ocuparia o sítio ativo da enzima, bloqueando a síntese de ceramida, uma precursora de esfingomielina e glicosfingolípídeos (Figura 2). Este bloqueio resulta no acúmulo tóxico 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 comportamento celular (SWEENEY apud WANG *et al.*, 1991; DILKIN *et al.*, 2003; MINERVINI;

FORNELLI; FLYNN, 2004). A esfingosina livre aparece no sangue e urina de animais que ingeriram fumonisina, podendo ser usada como biomarcador para a exposição (NORRED; VOSS, 1994). A fumonisina também age nos sítios de regulação celular, aparentemente independente da inibição do metabolismo lipídico, alterando a proliferação e a comunicação celular, adesão, apoptose, indução de estresse oxidativo e modulação de expressão gênica (ABADO-BECOGNEE et al., 1998).

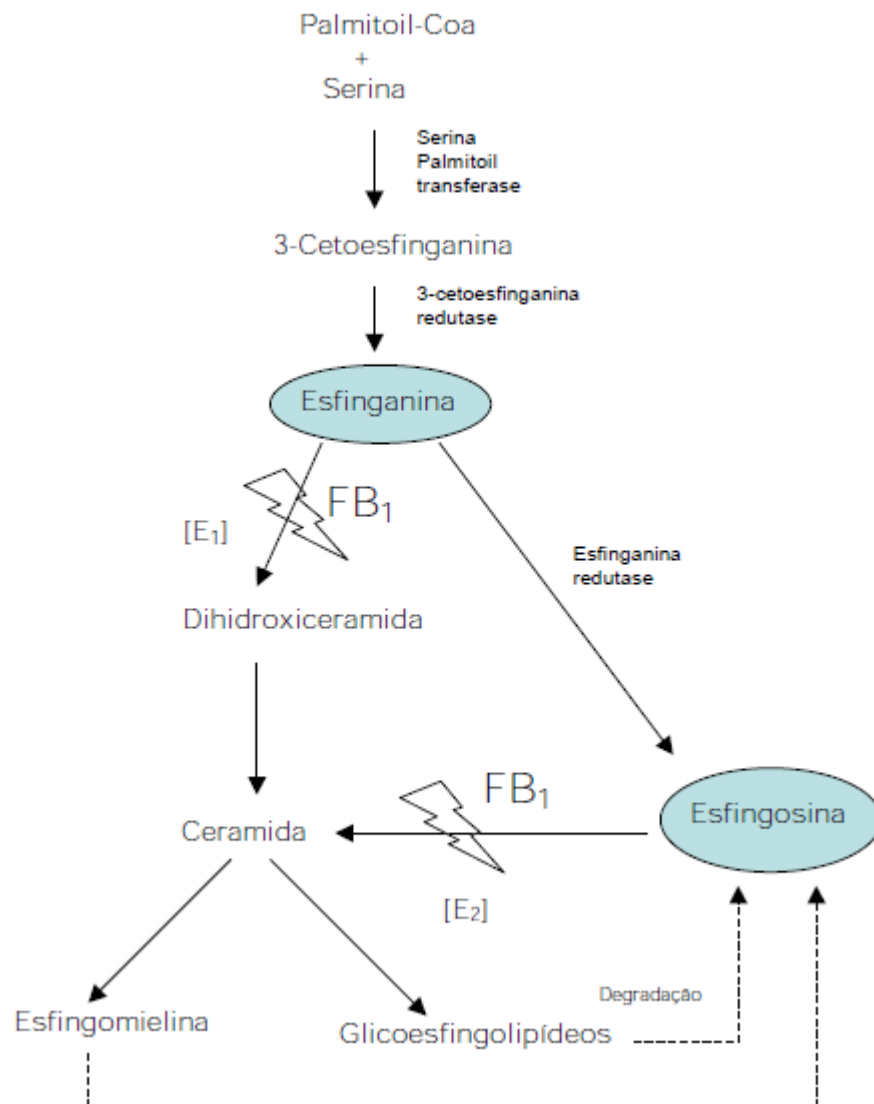


Figura 2. Mecanismo de ação da fumonisina B₁ em relação à síntese de esfingolipídios.

Fonte: WANG *et al.* (1991)

[E1] e [E2] – N-acil transferase (ceramida sintetase).

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; DESJARDINS; PATNER, 1993; GELDERBLUM; JASKIEWICZ; MARASAS, 1992). Entre os animais mais sensíveis estão os equinos,

acometidos por uma síndrome clássica de intoxicação conhecida como leucoencefalomácia equina – LEME (MARASAS et al., 1988; ROSS et al., 1990; THIEL et al., 1991; DESJARDINS et al., 2000). Surto têm sido relatados em vários países, incluindo Brasil, Argentina, África do Sul, China e Estados Unidos (HIROOKA et al., 1990; WILSON et al., 1990). A LEME consiste em uma doença de alta mortalidade, sendo os sintomas clínicos mais evidentes inapetência, letargia, movimento em pedalada, convulsão e morte (KELLERMAN et al., 1990).

Em suínos, a fumonisina causa a síndrome de edema pulmonar e hidrotórax (ROSS et al., 1990), sendo o quadro sintomatológico reproduzido pela inoculação intravenosa de FB₁ (HARRISON et al., 1990). A síndrome caracteriza-se por alteações hepáticas, cardiovasculares e pulmonares (HASCHEK; GUMPRECHT; SMITH, 2001). O quadro clínico geral consiste em dispnéia, inapetência e morte dentro de poucos dias (OSWEILER *et al.*, 1992).

Em ratos, a fumonisina apresenta atividade hepatotóxica e promotora de câncer hepático, ocasionando o surgimento de lesões necrosantes nos lóbulos hepáticos, alterações dos hepatócitos em nível nuclear, como picnose, hiperplasia, proliferação do ducto biliar e fibrose (NORRED; VOSS, 1994).

Em aves, os efeitos se manifestam através da redução no desenvolvimento, redução no ganho de peso, aumento de peso nos órgãos hepático e renal, problemas cardíacos, imunodepressão, degeneração e necrose hepática (LI *et al.*, 1999; WEIBKING et al., 1993). Além destes efeitos nestes animais, estudos demonstram a ocorrência de aterosclerose em macacos (NORRED; VOSS, 1994) e hemorragia cerebral em coelhos (BUCCI; HANSEN; LABORDE, 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; MARASAS; SYNDENHAM, 1992), norte da Itália (FRANCESCHI, *et al.*, 1990), Irã (SHEPHARD *et al.*, 2000), sudoeste dos Estados Unidos (GELDERBLUM; JASKIEWICZ; MARASAS, 1992) e com o desenvolvimento de câncer hepático primário na China (CHU; LI, 1994; GROVES *et al.*, 1999) e outros países, onde este cereal constitui a base da dieta diária.

Estudos mais recentes demonstraram que fumonisinas causam defeitos na formação do tubo neural em embriões de camundongos, tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (LA CAMPA; MILLER; HENDRICKS, 2004). Pesquisas com humanos demonstraram também

haver uma possível relação de defeitos do tubo neural em fetos e o alto consumo de milho pelas genitoras (GELINEAU-VAN WAES et al., 2009).

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 $\mu\text{g g}^{-1}$ para rações de equinos, suínos, bovinos e aves, respectivamente (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997). A Suíça recomenda o limite de 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ 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 $\mu\text{g g}^{-1}$ de fumonisinas ($\text{FB}_1+\text{FB}_2+\text{FB}_3$) para farelos de milho, 3,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ para milho pipoca e 4,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ para milho destinado à produção de massas (AVANTAGGIATO et al., 2002). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, Consulta Pública nº 100/2009) propõe os limites máximos de fumonisinas (FB_1+FB_2) de 0,2, 0,4, 1,0 e 2,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ para alimentos infantis a base de milho, outros produtos a base deste cereal, farinha de milho e milho não processado, respectivamente (ANVISA, 2010).

A elevada frequência desta micotoxina no milho brasileiro é preocupante. Os levantamentos apontaram a ocorrência de FB_1 e FB_2 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 FB_1 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; MELCION; RICHARD-MOLARD, 1995; WARFIELD; GILCHRIST, 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 quanto na armazenagem (BACON; NELSON, 1994).

A biossíntese de fumonisinas inicia no final da fase exponencial de crescimento pela via de policetidas, envolvendo moléculas de acetil – CoA provenientes do catabolismo de macromoléculas essenciais (GRIFFIN, 1994), conforme mostra a Figura 3.

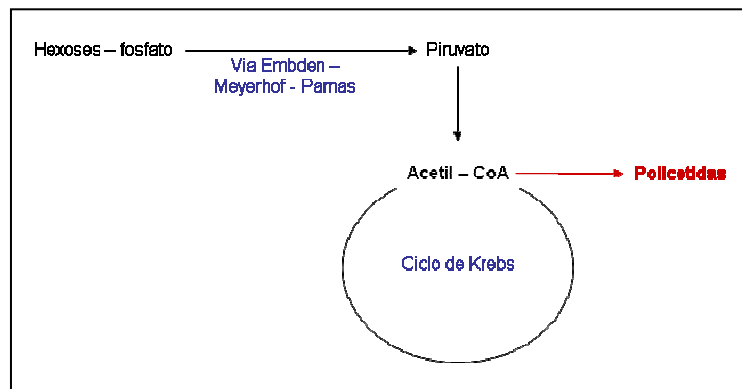


Figura 3. Via Metabólica das Policetidas.

Fonte: GRIFFIN (1994)

Alguns estudos sobre a biossíntese de fumonisinas procuraram elucidar a origem dos componentes da molécula dessa toxina (PLATTNER; SHACKELFORD, 1992; BRANHAM; PLATTNER, 1993; BLACKWELL *et al.*, 1996; CALDAS *et al.*, 1998; BOJJA *et al.*, 2004). Bojja *et al.* (2004) demonstraram que a cadeia carbônica das fumonisinas é originada a partir de um policetídeo com 18 carbonos, que seria complexado a um aminoácido para originar a cadeia com 20 átomos de carbono. Primeiramente, foi observado que os carbonos de 3 a 20 da cadeia das fumonisinas são derivados do acetato pela via ácido graxo sintetase, enquanto que o grupo hidroxila do C-4 poderia advir de uma molécula de hidrogênio dependente de hidroxilação (BRANHAM; PLATTNER, 1993; BLACKWELL *et al.*, 1996).

A fim de esclarecer a origem dos carbonos 1 e 2, pesquisas foram realizadas com base na semelhança estrutural entre fumonisinas e esfingosina, sendo levantada a hipótese de incorporação da alanina durante os primeiros passos da biossíntese de FB₁, o que seria análogo ao primeiro passo da via dos esfingolípídeos, onde ocorre condensação entre serina e palmitoil-CoA para a formação de 3-ceto esfinganina, catalisada pela enzima serina palmitoiltransferase (BRANHAM; PLATTNER, 1993).

Alanina marcada com isótopo radioativo foi adicionada como precursor em meio de cultura de *F. verticillioides*. As evidências apresentadas indicaram que a alanina é

incorporada diretamente na molécula de FB₁, e de maneira intacta, originando os carbonos 1 e 2 da micotoxina, bem como o grupo amino em C-2 (BRANHAM; PLATTNER, 1993).

A origem de várias outras moléculas que aparecem ligadas ao esqueleto carbônico das fumonisinas também foi amplamente pesquisada. Plattner e Shackelford (1992) investigaram a origem dos grupamentos metil das fumonisinas, e observaram que metionina marcada com deutério foi incorporada nos carbonos 12 e 16, indicando que ambos os grupos metil posicionados nesses carbonos são derivados da metionina.

Caldas *et al.* (1998) verificaram que o oxigênio presente nas moléculas de ácido tricarbálico (TCA) da FB₁ foram derivados da H₂O, enquanto que as hidroxilas presentes na cadeia de FB₁ foram originadas do oxigênio molecular. Também foi constatado que o grupo hidroxila do carbono 3 da FB₁ é oriundo de um grupo carbonil, derivado do acetato, enquanto as hidroxilas dos carbonos 5, 10, 14 e 15 são provavelmente derivadas do oxigênio molecular.

Por fim, as moléculas de TCA parecem ser originadas de intermediários do ciclo do ácido cítrico, ou do aconitato, ou do citrato (BLACKWELL *et al.*, 1996; BOJJA *et al.*, 2004).

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; SUMNER; BULLERMAN, 1998) ou acetonitrila-metanol-água (VISCANTI; SOLFRIZZO; DE GIROLAMO, 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 fumonisinas 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 *et 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; ABOUZIED; SUTKNO, 1995; ONO *et al.*, 2000).

Outrossim, a técnica para detecção de fumonisinas 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; JARDIM; AIROLD, 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 elevado, não se recomendando o uso de pH superior a 7,5, devido à dissolução da fase sólida (AMERSHAM PHARMACIA 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; MARASAS; THIEL, 1992; SHEPHARD *et al.*, 1990).

3.4 Estratégias de Controle e Minimização da Ocorrência de *Fusarium verticillioides* e de Fumonisinas em Milho

O milho não é somente um dos principais cereais cultivados em todo o mundo, mas é também uma das culturas mais sujeitas à contaminação por micotoxinas (MUNKVOLD, 2003).

A ocorrência de micotoxinas em milho é afetada principalmente pelo clima e pela geografia, mas também sofre influência de sistemas de plantio, práticas de cultivo, manejo pós-colheita dos grãos, dentre outros (MUNKVOLD, 2003; BAPTISTA *et al.*, 2004; REYNERI, 2006).

O efeito maléfico das micotoxinas e patologias causadas por *F. verticillioides* em grãos de milho é reconhecido há bastante tempo, entretanto, o manejo e minimização de suas ocorrências permanece ainda oneroso e inadequado (MUNKVOLD, 2003).

Diversas estratégias têm sido estudadas como possíveis soluções para esse problema. A minimização da ocorrência de fumonisinas e *F. verticillioides* pode ser alcançada por meio de práticas de cultivo pré e pós-colheita, controle durante a colheita, ou ainda por meio de estratégias genéticas e de descontaminação (DUVICK, 2001; MUNKVOLD, 2003; BAPTISTA; HORII; BAPTISTA, 2004; SORIANO; DRAGACCI, 2004; REYNERI, 2006).

Diversos métodos de descontaminação físicos, químicos e biológicos são descritos na literatura. Muitos desses métodos apresentam resultados promissores em relação à ocorrência de fumonisinas, entretanto, não existe ainda um método que seja eficaz para a grande gama de micotoxinas que co-ocorrem em grãos de milho, o que torna os processos de descontaminação onerosos e, portanto, inaplicáveis em sua maioria. Além disso, a maioria dos métodos de descontaminação foi estudada apenas *in vitro*, sendo que seus resultados e sua

eficácia não necessariamente se aplicam *in vivo* (MUNKVOLD, 2003; SORIANO; DRAGACCI, 2004).

Além dos métodos de descontaminação, algumas estratégias genéticas têm sido pesquisadas para minimizar a ocorrência de fumonisinas em milho. Algumas dessas estratégias baseiam-se na utilização de híbridos de milho resistentes a *F. verticillioides*; e embora certo progresso tenha sido atingido, híbridos altamente resistentes ainda não se encontram disponíveis para utilização. O desenvolvimento de transgênicos também tem sido amplamente pesquisado, mas os resultados desses estudos não são ainda aplicáveis, e muitos anos podem ser necessários para que um resultado satisfatório seja atingido (DUVICK, 2001; MUNKVOLD, 2003).

Portanto, atualmente as estratégias mais eficazes e utilizadas para o controle e minimização da ocorrência de fumonisinas em milho são práticas de cultivo. Dentre essas estratégias, pode-se citar o manejo da infestação por insetos e dos resíduos de cultivos anteriores, a rotação de culturas, manejo do tempo de colheita e de condições de armazenamento dos grãos, fertilização do solo, utilização de biocontrole, aplicação de fungicidas, dentre outras (MUNKVOLD, 2003; REYNERI, 2006).

3.4.1 Manejo da Cultura

3.4.1.1 Fertilização do solo

A deficiência, excesso ou desequilíbrio nas combinações de elementos nutricionais, pode influenciar a reação das plantas à infecção por patógeno, de forma a aumentar o nível de defesa ou favorecer a ocorrência de doenças, com a possível produção de micotoxinas pelo patógeno (MARSCHNER, 1996).

Para a instalação da cultura do milho e demais culturas é necessário diagnosticar a necessidade de corretivos e fertilizantes. Para isso, as análises químicas do solo e da planta são ferramentas eficazes para se avaliar a fertilidade atual do solo e o estado nutricional da cultura, tendo como fim específico, o planejamento e aferição da ação de planejamento (quantidade, época ou forma de aplicação), facilitando o manejo, aumentando o potencial

produtivo da lavoura e as defesas da planta contra patógenos (FANCELLI ; DOURADO NETO, 2000).

O milho é uma das culturas mais exigentes em fertilizantes, especialmente nitrogenados e fosfatados. O suprimento inadequado de nitrogênio é considerado um dos principais fatores limitantes ao rendimento de grãos do milho, pois o mesmo exerce importante função nos processos bioquímicos da planta. A exigência de nitrogênio (N) pelas plantas é consequência da sua função estrutural, pois ele faz parte da molécula de compostos orgânicos, como os aminoácidos e proteínas, sendo ainda ativador de muitas enzimas (RAIJ, 1991). O vegetal também depende do N para realização de um ou mais processos vitais como síntese de proteína, fotossíntese, respiração, multiplicação e diferenciação celular (BÜLL, 1993). O emprego adequado do fertilizante pode aumentar significativamente a área foliar e a produção de matéria seca, acarretando em maior produtividade, e conseqüentemente, maiores lucros (ARAÚJO; FERREIRA; CRUZ, 2004).

A uréia é um dos fertilizantes nitrogenados mais utilizados no Brasil (corresponde a 60 % dos fertilizantes nitrogenados empregados na agricultura brasileira), apresentando diversas vantagens, como alta concentração de nitrogênio (45 %), baixo custo de transporte, alta solubilidade, baixa corrosividade e facilidade de mistura com outras fontes. Entretanto, a uréia apresenta como desvantagem alta higroscopicidade e facilidade de perda por volatilização de amônia quando aplicada à superfície do solo, em decorrência da presença da enzima urease produzida por microrganismos do solo (RAIJ, 1991; OVERREIN; MOE, 1967).

A incorporação de inibidores de urease é uma alternativa para prevenir a perda de nitrogênio devido à hidrólise por essa enzima. O inibidor inativa a urease, retardando o início da reação de hidrólise e diminuindo, portanto, as perdas por volatilização (CARMONA; CHRISTIANSON; BYRNES, 1990; MOBLEY; HAUSINGER, 1989). Uma prática tradicionalmente adotada no Brasil é a aplicação de nitrogênio de forma parcelada, correspondente a 30 % ou menos do total na semeadura e o restante em cobertura com a finalidade de evitar excesso de sais no sulco de semeadura e, principalmente, perdas de nitrogênio por lixiviação e volatilização (CANTARELLA; DUARTE, 2004).

A deficiência de nitrogênio reduz a densidade de grãos entre 9 e 25 % e a produtividade de grãos, entre 14 e 80 %, porque esse elemento, além de afetar a determinação do número de células endospermáticas e de grânulos de amido, pode reduzir a fonte de fotoassimilados, devido à diminuição do índice e duração de área foliar (NEHMI et al., 2004). Plantas de milho expostas ao estresse por falta de fertilidade do solo também são altamente

susceptíveis à infecção por microrganismos. Diversos autores relataram alta incidência de doenças causadas por fungos toxigênicos em milho devido ao *stress* por falta de fertilizante (SHELBY; WHITE; BAUSKE, 1994; RODRIGUEZ-DEL-BOSQUE, 1996; MILLER, 2001; MUNKVOLD, 2003). Lisker e Lillehoj (1991) demonstraram que altos níveis de aflatoxinas podem estar relacionados a estresses por deficiência de nutrientes, em especial nitrogênio.

Por outro lado, apesar do aumento de doses de fertilização nitrogenada geralmente promover maiores produtividades, as condições para infestação fúngica podem também ser favorecidas em decorrência de um crescimento vegetativo mais prolongado, que aumentaria a exposição das folhas a patógenos, e de maior expansão foliar, que tornaria as paredes celulares mais delgadas e, portanto, mais vulneráveis à penetração fúngica (HASSEGAWA *et al.*, 2008). A aplicação de doses de aproximadamente 200 Kg ha⁻¹ de nitrogênio, em geral, reduziu a ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em grãos de milho (JONES; DUNCAN, 1981; HASSEGAWA *et al.*, 2008; BLANDINO *et al.*, 2004).

Blandino; Reyneri e Vanara (2008) avaliaram a influência de diferentes doses (100, 200, 300 e 400 Kg ha⁻¹) e fontes de nitrogênio (uréia e fertilizante de liberação lenta) na ocorrência de micotoxinas em safras de 2000, 2001 e 2002. Os resultados demonstraram que mais de 80 % da contaminação por fumonisinas ocorreu em situações de deficiência de nitrogênio. Entretanto, doses muito elevadas de fertilizante nitrogenado também favoreceram a contaminação por fumonisinas. Portanto, uma aplicação balanceada de fertilizante nitrogenado seria a melhor solução para prevenir a contaminação de grãos de milho por fumonisinas.

A fertilização nitrogenada, em geral, mostra-se como um fator de extrema importância para a contaminação por fumonisinas em grãos de milho, podendo ser utilizada para diminuir os riscos de contaminação por micotoxinas. Ressalta-se, no entanto, que além da concentração, a fonte de nitrogênio pode estar correlacionada à produção de micotoxinas em milho, e deve ser também explorada a fim de minimizar a ocorrência dessas toxinas e dos fungos que as produzem, proporcionando maior segurança alimentar (HASSEGAWA *et al.*, 2008). Em estudo realizado por Blandino; Reyneri e Vanara (2008), a utilização de uréia (200 Kg ha⁻¹) esteve relacionada à menor ocorrência de fumonisinas, enquanto que a utilização na mesma concentração de fertilizante de liberação lenta favoreceu a ocorrência destas micotoxinas, em todos os anos avaliados. Esse fenômeno ocorre porque o fertilizante de liberação lenta pode promover um prolongamento da fase vegetativa (*staygreen*) nas plantas de milho, até mesmo no último período de amadurecimento, fornecendo melhores condições para o desenvolvimento fúngico (BLANDINO; REYNERI; VANARA, 2008).

Desta maneira, o suprimento adequado de nutrientes em culturas de milho deve fornecer boa produtividade e ao mesmo tempo diminuir o risco de contaminação por micotoxinas. Entretanto, a quantidade de fertilizante nitrogenado que deve ser aplicado com esse objetivo não é fácil de definir, uma vez que tanto a produtividade, quanto a contaminação por micotoxinas podem ser também influenciadas por outros fatores e técnicas de cultivo, como época de plantio, densidade de plantas, híbridos utilizados, microclima, interação com outros nutrientes (BLANDINO; REYNERI; VANARA, 2008; HASSEGAWA *et al.*, 2008).

Além do nitrogênio, a deficiência do fósforo (P) também limita a produtividade do milho na maioria das áreas de cultivo. A cultura mostra-se mais exigente em fósforo por ocasião da formação e desenvolvimento dos grãos. O fósforo está relacionado ao crescimento das raízes, a maturação de frutos, a formação de grãos, frutos e fibras e ao vigor das plantas (VITTI; WIT; FERNANDES, 2004). O P é parte integrante de diversas moléculas químicas, como açúcares fosfatados, nucleotídeos, coenzimas, fosfolipídeos, ácido fítico, além de ser parte estrutural do difosfato de adenosina (ADP) e do trifosfato de adenosina (ATP) (STAUFFER; SULEWSKI, 2003).

O suprimento de P nos estádios iniciais de crescimento é fundamental para o desenvolvimento da planta. A resposta do milho à aplicação de P na semeadura está relacionada com a concentração foliar de P nos estádios de V₄ a V₅, ou possivelmente mais cedo. Especula-se que mais fósforo na semeadura favoreça a produção de maior número de grãos, pois uma deficiência de P durante a formação da espiga, que ocorre entre os estádios V₆ e V₇, reduz o tamanho da mesma, levando a um menor número de grãos por espiga (GRANT *et al.*, 2001).

Apesar da importância do suprimento de P nas fases iniciais do desenvolvimento da cultura, é necessário que o fornecimento continue nas fases posteriores, pois a absorção máxima ocorre durante o florescimento e seu acúmulo nos grãos ocorre devido à redistribuição do P contido nas folhas e caules. Dessa forma é preciso garantir também o suprimento de fósforo até a fase de maturação para o funcionamento do mecanismo de translocação de carboidratos, para que não haja redução na produção de grãos. O fósforo utilizado na formação dos grãos pode ser suprido pela absorção do solo, pós-antese, assim como, pela redistribuição interna do fósforo acumulado nas fases iniciais (GRANT *et al.*, 2001).

O potássio (K) é outro elemento que tem papel fundamental na fotossíntese, na transformação da energia luminosa em energia química (ATP e NADPH). Como todas as funções vitais da planta dependem, direta ou indiretamente, de ATP e NADPH, o efeito do

potássio se refletirá em: maior assimilação de CO₂; maior translocação de carboidratos produzidos nas folhas para os outros órgãos da planta, maior síntese de sacarose, amido, lipídeos, aminoácidos e proteínas; uso eficiente da água, pelo melhor controle na abertura e fechamento dos estômatos; maior eficiência enzimática, por atuar como ativador em reações enzimáticas e por permitir maior suprimento de proteínas (FORNASIERI FILHO, 2007).

Estudos evidenciam a influência da adubação NPK na composição química de grãos para teor protéico e composição mineral em milho (GALLO, TEIXEIRA; SPOLADORE (1976); POMMER; SAWAZAKI, 1981; CARMO et al., 2003, MARSARO JUNIOR et al., 2007).

O suprimento balanceado dos nutrientes P e K, o qual favorece o crescimento normal de plantas, é também, similarmente ao fornecimento de N, considerado como relevante para seus processos de defesa (MARSCHNER, 1995). Estudos demonstram que o fornecimento de P e K às plantas reduziu a severidade de doenças. O aumento das quantidades de K na adubação retardou a incidência de *Phomopsis phaseol* em soja (ITO *et al.*, 1994) e o desenvolvimento de míldio em cebola (DEVELASH e SUGHA, 1997). Balardin *et al.* (2006) verificaram redução tanto na severidade final quanto na taxa de progresso da ferrugem em soja com o aumento nos níveis de P (0, 42,5, 85 e 170 kg ha⁻¹) e K (0, 35, 70 e 140 kg ha⁻¹) na adubação.

3.4.1.2 Densidade de plantas e espaçamento entre linhas

O arranjo espacial das plantas de milho varia em função do espaçamento entre linhas e do número de plantas na linha de semeadura, mas diferentemente de outras gramíneas, o milho não compensa reduzidas densidades de semeadura, pelo motivo de raramente emitir afixos férteis e quando emitido, dificilmente resultará em uma espiga adequada. As alterações no arranjo de plantas em milho devem-se às modificações de ordem genética, fisiológica, bioquímica e anatômica. Estas modificações foram incorporadas pelos programas de melhoramento nas últimas décadas, aumentando a tolerância da cultura ao estresse (TOLLENAAR; AGUILERA; NISSANKA, 1997; TOLLENAAR; WU, 1999; SANGOI, 2000). O manejo da densidade de plantas é uma das práticas culturais mais importantes para determinar o rendimento de grãos no milho, pois o estande afeta a

arquitetura das plantas, altera o crescimento e o desenvolvimento, e influencia na produção e partição de fotoassimilados (ALMEIDA; SANGOI 1996).

Vários pesquisadores consideraram o próprio genótipo como principal determinante para o adequado dimensionamento da densidade de plantas (RUTGER; CROWDER, 1967; SOUZA, 1976). Esses trabalhos evidenciam uma associação direta entre ciclo e capacidade de resposta dos genótipos. Além dos genótipos, a radiação solar é outro fator que tem sido objeto de pesquisas para determinar a densidade ótima para a obtenção do máximo rendimento de grãos de milho. Neste sentido, trabalhos experimentais demonstram redução do rendimento de grãos de milho sob condições de sombreamento e aumento sob condições em que há aumento de luminosidade (HASHEMI & HERBERT, 1992).

Tradicionalmente, o espaçamento entre linhas adotado pela maioria dos produtores brasileiros concentra-se entre 0,80 e 0,90 m (DOURADO NETO et al., 2003). Atualmente, a densidade alta e o espaçamento reduzido fazem parte do novo enfoque do arranjo de plantas na cultura do milho (SILVA et al., 2006). Por meio do melhoramento genético, novos híbridos de milho, com arquitetura modificada, folhas menores e mais eretas, têm permitido o aumento na densidade, resultando em maiores produtividades (SHIOGA; OLIVEIRA; GERAGE, 2004). O incremento na densidade pode compensar a redução na área foliar quando se utilizam cultivares precoces por aumentar o índice de área foliar capaz de potencializar a interceptação da radiação solar (SANGOI et al., 2002).

No entanto, o incremento na população de plantas, principalmente sob espaçamento reduzido entre linhas, aumenta a competição entre indivíduos por água, luz e nutrientes, reduzindo a disponibilidade de fotoassimilados para atender a demanda para enchimento do grão e manutenção das demais estruturas da planta (SANGOI; SALVADOR, 1997).

Além disto, esta prática pode aumentar a incidência de doenças foliares, de colmo e de espiga na cultura do milho (CASA; REIS, 2003). Com densidades elevadas, há menor circulação de ar no interior do dossel, o que favorece um período mais prolongado de deposição de orvalho nas folhas, estimulando a germinação de esporos de fungos que ocasionam doenças foliares (SANGOI et al., 2003). Altas populações impõem restrições à atividade fotossintética das folhas, sendo que a limitação imposta às folhas induz o colmo a redirecionar fotoassimilados em maior quantidade ao enchimento de grãos, fragilizando-o e facilitando a ocorrência de podridões (SANGOI et al., 2000). Diversos patógenos responsáveis por podridões de colmo podem migrar para a espiga, favorecendo a ocorrência de grãos ardidos (RIBEIRO et al., 2005).

Trento; Irgang e Reis (2002) relataram em cultivo de milho localizado em Passo Fundo, RS, safra 1999, que a incidência de grãos ardidos foi maior à medida que se aumentou a densidade de plantas (30, 40, 50, 60 e 70 mil plantas ha⁻¹). Similarmente, Sangoi et al. (2000) observaram que o aumento da população de plantas em Lages, SC, safra 1998, promoveu um incremento na incidência das doenças de colmo causadas por *Fusarium moniliforme*, *Colletotrichum graminicola* e *Diplodia maydis*.

Pesquisas têm sido concentradas na manipulação do arranjo espacial e na definição de espaçamento entre linhas próprias para híbridos de milho atualmente utilizados e para épocas convencionais de cultivo, visando a otimização do potencial produtivo deste cereal. No entanto, escassos estudos relacionam estas práticas de manejo com a redução da qualidade de grãos devido à contaminação fúngica e por micotoxinas. Além disto, poucos estudos relativos a estes manejos são realizados no período de segunda safra (safrinha), onde as condições climáticas são desfavoráveis para o cultivo do milho, ou seja, a radiação incidente e a temperatura são decrescentes, ocorrem menores precipitações pluviométricas e há distribuição irregular das chuvas durante o ciclo da cultura (EMBRAPA, 2010). Segundo Agrios (1988), a utilização de populações elevadas de plantas, aliada a desequilíbrios nutricionais, condições climáticas e à susceptibilidade dos genótipos, contribui para o aumento da incidência de podridões de espiga e de grãos ardidos. Um manejo adequado pode ser considerado uma opção econômica e eficiente para minimizar os danos causados por fungos e, aliado à alta produtividade, produzir grãos com qualidade sanitária.

3.4.2 Utilização de Rizobactérias

As estratégias de controle, objetivando a redução da infecção por fitopatógenos em cereais, leguminosas e oleaginosas são geralmente baseadas no uso de agrotóxicos (KANAMPIU et al., 2002). O massivo uso destes produtos promove a poluição da água, degradação do solo e aumento da resistência de insetos (PEREIRA et al., 2010). O uso de agentes de controle biológicos com efeitos antagonistas em patógenos pode representar uma alternativa promissora (WHIPPS, 1997; BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001).

As raízes servem de sustentação para a planta no solo, e também interagem com microorganismos que contribuem para o crescimento e sobrevivência das plantas. Dentre esses microorganismos, as rizobactérias se destacam por colonizar o sistema radicular de

plantas e promover o crescimento, resultando em plantas mais vigorosas, saudáveis, com maior produtividade e defesa contra patógenos (AGRA, 2007).

A rizosfera é um habitat mutável, sendo que a sua estrutura é influenciada durante o ciclo vegetativo da planta e suas dimensões são determinadas pelo tipo, composição e umidade do solo (PEREIRA, 2000). A colonização de bactérias na rizosfera deve-se a uma maior disponibilidade de nutrientes em relação ao solo não-rizosférico. Esta disponibilidade é resultado da translocação de fotossintatos da parte aérea das plantas, via floema, para as raízes, onde sustentam os processos biossintéticos, sendo uma parte liberada para o solo rizosférico (FREITAS, 2008).

As rizobactérias são microrganismos que habitam a rizosfera, ou seja, a região que recebe influência das raízes, e fazem parte da população residente das plantas como epifíticas ou endofíticas. Estas bactérias possuem a capacidade de colonizar as raízes e outros tecidos internos do vegetal, não são fitopatogênicas e, além de fixarem N atmosférico, as rizobactérias produzem hormônios de crescimento como auxinas e giberelinas, que estimulam o crescimento vegetal, principalmente de raízes, atuando na maior absorção de nutrientes e água (QUADROS, 2009), ou seja, associam-se às plantas numa relação não simbiótica (SOTTERO, 2003). Dentre as principais rizobactérias promotoras de crescimento às plantas (RPCP) destacam-se: *Pseudomonas* spp. fluorescentes, *Bacillus* spp., *Azospirillum* spp. e *Azotobacter* spp. (COELHO et al., 2007).

Existem relatos de promoção de crescimento por rizobactérias em diversas culturas como: trigo (LUZ, 2001), *Heliconia psittacorum* (SANTOS et al., 2005) e citros (FREITAS; VILDOSO AGUILAR, 2004). A promoção de crescimento leva ao aumento na produção de grãos e crescimento da planta, podendo ser expressos pela massa da matéria seca de parte aérea ou raízes, e pela altura (COELHO et al., 2007).

O crescimento das plantas também pode ser influenciado pela ação de rizobactérias no aumento na disponibilidade de nutrientes para as plantas, decorrente da solubilização de fosfato inorgânico e da mineralização de fosfato orgânico. Estudos realizados com *Bacillus megaterium* e *Pseudomonas fluorescens* mostraram que estas bactérias podem incrementar a disponibilidade de fósforo (KLOEPPER; LIFSHITZ; SCHROTH, 1988) e que um grande número de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* são capazes de solubilizar fosfato inorgânico (HALDER; CHAKRABARTY, 1993).

As bactérias do gênero *Pseudomonas* têm recebido especial atenção por sua capacidade em promover o crescimento vegetal, especialmente pela sua habilidade em melhorar a nutrição fosfatada das plantas pela solubilização de fontes não disponíveis de

fósforo (AFZAL; BANO, 2008). A diversidade metabólica das *P. fluorescens* permite a sua adaptação em vários ambientes, tais como solo e rizosfera (LATOUR; LEMANCEAU, 1997).

Outro mecanismo de ação responsável pela produção de crescimento em plantas pode estar relacionado à produção de metabólitos como antibióticos, sideróforos e ácido hidrociânico, que diminuem o crescimento de fitopatógenos e outros microorganismos nocivos à planta (GLICK, 1995; MYOUNGSU et al., 2005). A inibição do crescimento de *Phoma betae* (*Pleospora betae*) e *Rhizoctinia solani*, isoladas de sementes e raízes de beterraba, foi obtida através de inoculação com *Pseudomonas* fluorescentes, associadas à produção de fenazina (LOVIC et al.; 1993).

Bressan (2003) verificou que a aplicação de *Streptomyces* spp. reduziu significativamente a população de *Fusarium subglutinans*, *Cephalosporium Acremonium* e *Penicillium* spp. em grãos de milho. Sob condições *in vitro*, Cavaglieri; Passone e Etcheverry (2004) verificaram que onze cepas de bactérias isoladas da região rizosférica de milho (*Arthrobacter globiformis* RC1, *Azotobacterarmeniacus* RC2, *A. armeniacus* RC3, *A. globiformis* RC4, *A. globiformis* RC5, *A. armeniacus* RC6, *Pseudomonas solanacearum* RC7, *Bacillus subtilis* RC8, *B. subtilis* RC9, *P. solanacearum* RC10, *B. subtilis* RC11) proporcionaram diminuição significativa no crescimento de *F. verticillioides* e aumentaram a sua fase lag. Além disto, as bactérias antagonistas reduziram a produção de fumonisina B₁. Cavaglieri; Orlando e Etcheverry (2005) verificaram que isolados de *Microbacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e gêneros *Enterobacter* reduziram a colonização rizosférica de milho por *F. verticillioides*. Cepas de *Bacillus cenocepacia*, isoladas da rizosfera de milho, foram capazes de reduzir o crescimento de *F. verticillioides in vitro* (BEVIVINO et al., 2005). Pereira; Nesci e Etcheverry (2007) observaram que a aplicação de *Bacillus amyloliquefaciens* e *Microbacterium oleovorans* como revestimento de sementes de milho foi eficaz na redução da contagem de *F. verticillioides* e produção de fumonisinas B₁ e B₂. Hernández-Rodríguez et al. (2008) relataram que rizobactérias (*Burkholderia* spp. e *P. fluorescens*) exibiram efeito antagonista em *F. verticillioides* M1 inoculado em milho. *P. fluorescens* (cepas MKB 158 e MKB 249) e *P. frederiksbergensis* (cepa 202) reduziram significativamente a severidade de doenças causadas por *F. culmorum* no trigo e cevada (KHAN; DOOHAN, 2009).

No entanto, mais estudos de campo são requeridos para auxiliar na visão integral das relações entre plantas, patógenos e agentes de biocontrole, a fim de avaliar a segurança da introdução de agentes de controle biológico.

3.5 Modelos Matemáticos Preditivos para Fungos Micotoxígenos

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 submetidos a um ambiente particular. Os resultados são resumidos na forma de equações matemáticas as quais, por interpolação, podem ser usadas para 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 isenta 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 se multiplicar neste substrato (WIJZES *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).

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 WIJZES *et al.*, 1993).

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, aliadas às características físicas (difusibilidade, condutibilidade e solubilidade) e composição química do produto (DANTIGNY; GUILMART; BENSOUSSAN, 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.

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 disto, 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 predizer, 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).

Além disso, diferindo de bactérias envolvidas em 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; HOESKSTRA; FRISVAD, 1995).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Infra-estrutura

Os ensaios *in vitro*, bem como as análises micológicas, físico-químicas e quantificação de fumonisinas, foram realizados nos laboratórios do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos e do Departamento de Bioquímica (Centro de Ciências Exatas) da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

A condução do experimento referente à densidade de plantas e doses de nitrogênio na cultura do milho foi realizada no Distrito da Prata, pertencente ao município de Cambé – PR. Já em relação ao experimento com inoculação a base de *Pseudomonas fluorescens* e adubação NPK na cultura do milho, foi realizado no município de Londrina – PR, ambos localizados na região Norte do Estado do Paraná e sob coordenação do Prof. Claudemir Zucareli (Docente do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Departamento de Agronomia/ CCA/ UEL).

4.1.2 Matéria-prima

A matéria-prima utilizada no desenvolvimento dos ensaios *in vitro* foi o milho do híbrido simples Tork, cultivado nas safras 2005 e 2007, e o híbrido P30F53, cultivado na safra de 2007, sendo fornecida pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) e mantida a 5 °C até o momento do uso.

Nos ensaios sob condições de campo, as sementes utilizadas nos estudos foram dos híbridos P30F35 e AG9010.

4.1.3 *Fusarium verticillioides* e *Pseudomonas fluorescens*

Em ensaios *in vitro* foi utilizado *F. verticillioides* cepas 97K (1 cepa), 103F (14 cepas), 113F (3 cepas), 119B (1 cepa) e 119BR (1 cepa) com datas de repique entre 1991 a 2007, pertencentes à coleção de cepas do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UEL, tendo sido originalmente isoladas de rações envolvidas em surtos de intoxicação animal no ano de 1991 no Estado do Paraná.

No estudo com a inoculação de rizobactéria e adubação NPK na cultura do milho, utilizou-se o produto comercial Rizofos liq Maíz[®], o qual representa um inoculante a base de *P. fluorescens*.

4.2 Métodos

A metodologia executada no transcurso da pesquisa foi esquematizada sob forma de fluxograma no tópico Delineamento Experimental, mostrados nas Figuras 4 a 13. O procedimento técnico, redigido em detalhes, foi inserido em cada capítulo descrito no item Resultados e Discussão, visando posterior publicação.

Tendo como uma das metas a definição de condições críticas para o crescimento de *F. verticillioides* e a produção de fumonisina, o delineamento experimental foi baseado no fluxograma iniciado no ano de 2004, com a dissertação de Mestrado (BERND *et al.*, 2008). A seguir, consta a sequência sucinta sobre a evolução da pesquisa desenvolvida.

4.2.1 Delineamento Experimental

4.2.1.1 Validação de Modelagem Matemática para Definição de Condições Ótimas para Produção de Fumonisinias

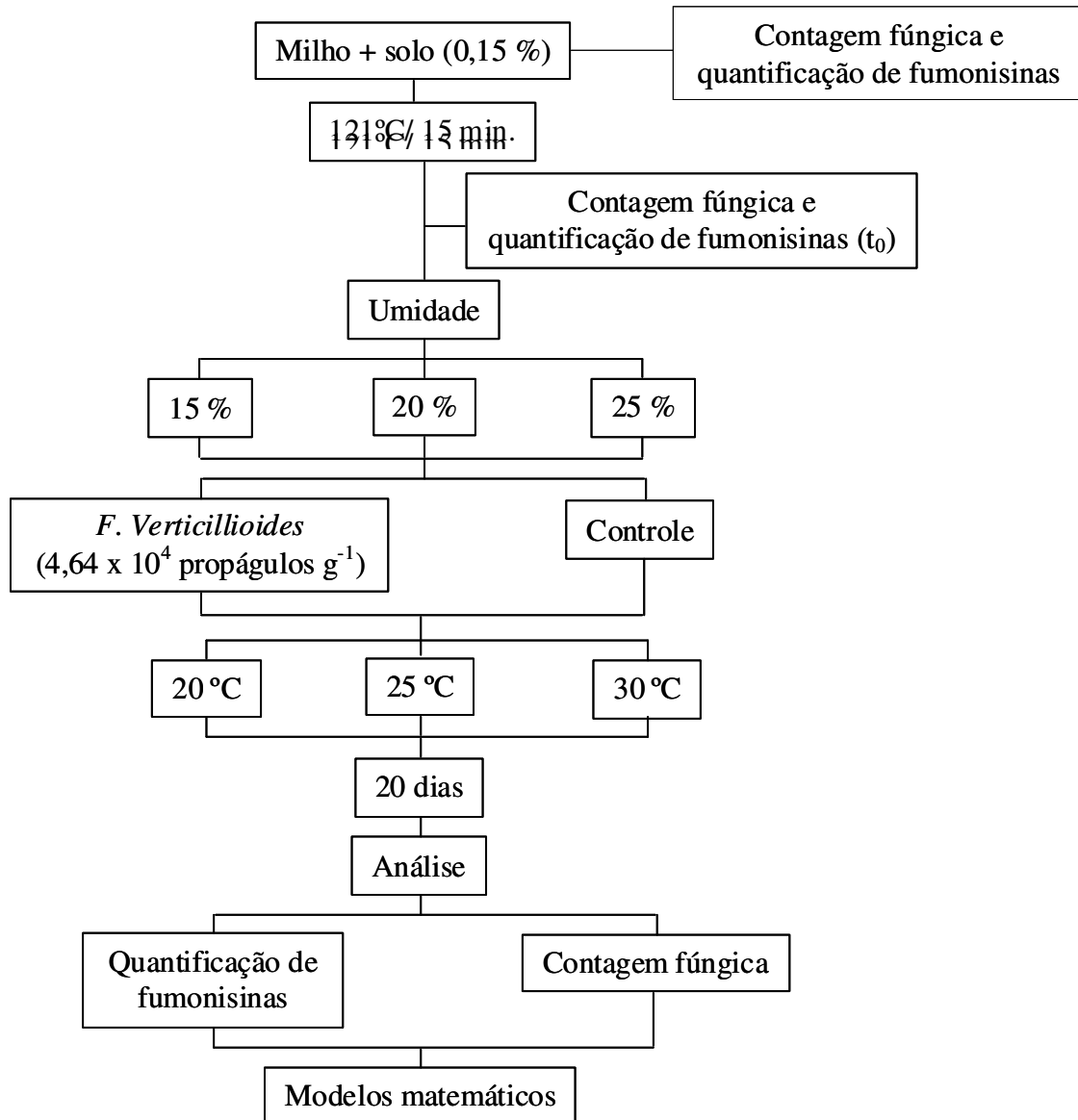


Figura 4. Procedimento operacional para validação de modelagem matemática para definição de condições ótimas para produção de fumonisinias.

4.2.1.2 Simulação de Choque Drástico de Temperatura na Contagem Fúngica e Produção de Fumonisina

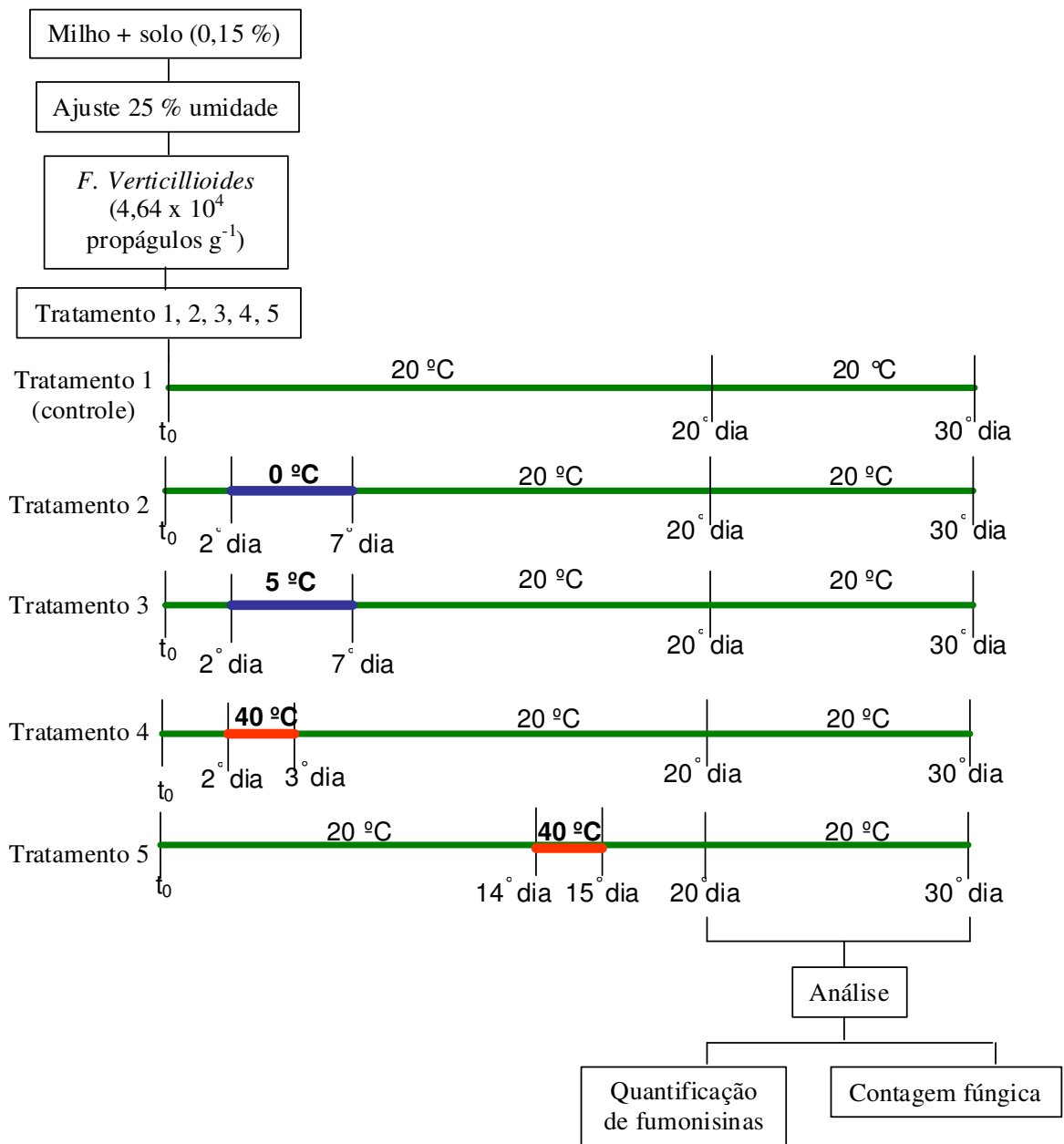


Figura 5. Procedimento operacional de simulação de choque drástico de temperatura.

4.2.1.3 Avaliação de Toxigenicidade de Cepas de *F. verticillioides* com Datas de Repique entre 1991 a 2007

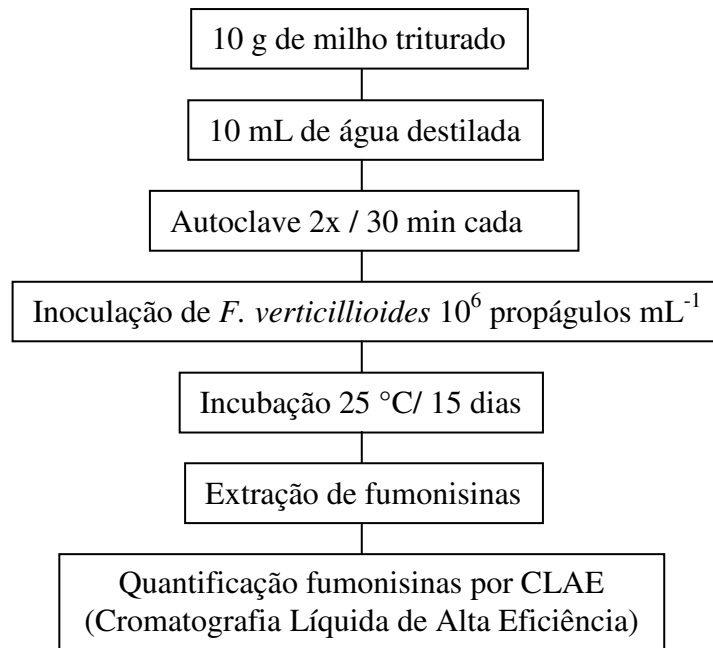


Figura 6. Fluxograma operacional do teste de toxigenicidade de cepas de *F. verticillioides*.

4.2.1.4 Fatores Bióticos e Abióticos na Produção de Fumonisina e Crescimento de *F. verticillioides*

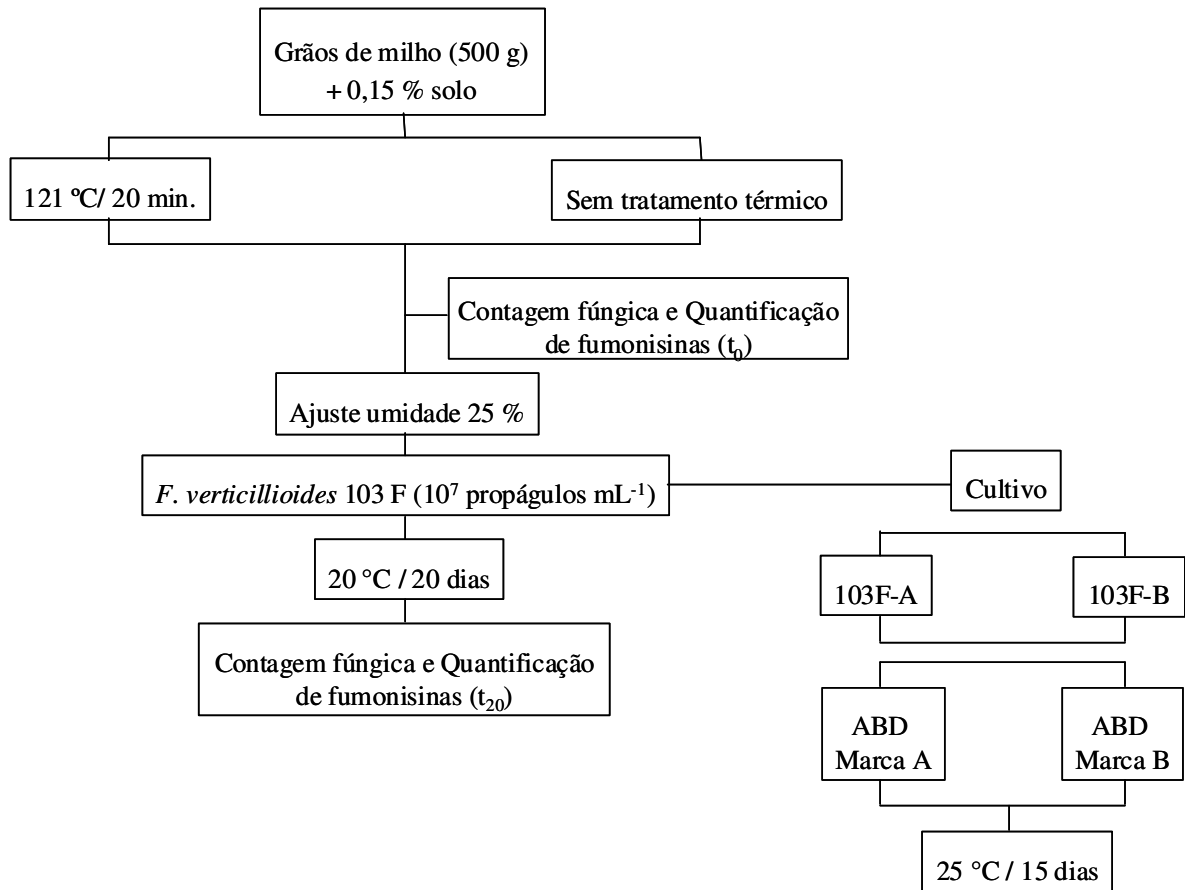


Figura 7. Procedimento operacional de fatores bióticos e abióticos na produção de fumonisin e crescimento de *F. verticillioides*.

4.2.1.5 Definição de Condições Críticas para Produção de Fumonisina e Crescimento de *F. verticillioides*

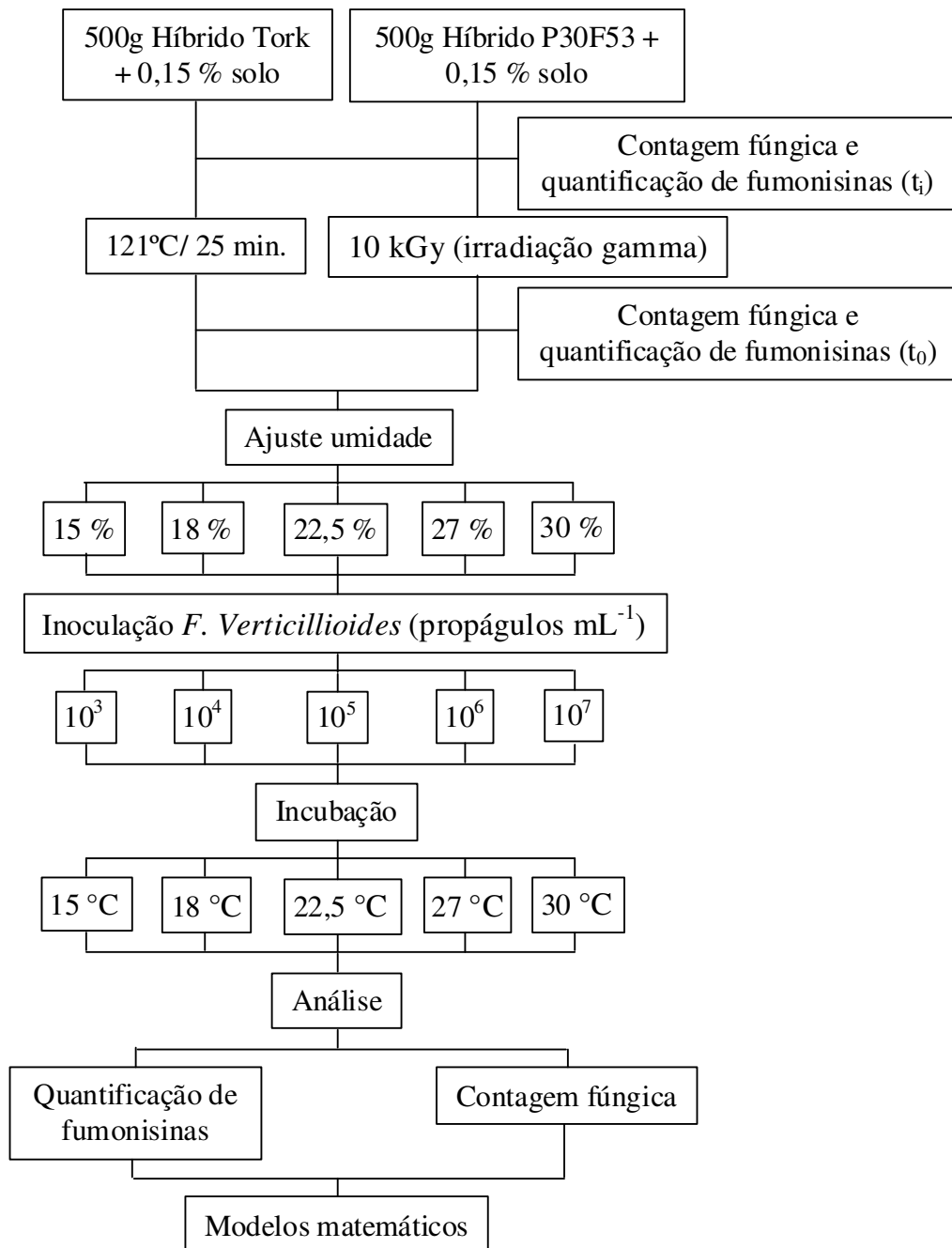


Figura 8. Procedimento operacional para definição de condições críticas para produção de fumonisina e crescimento de *F. verticillioides*.

4.2.1.6 Cinética de Produção de Fumonisina, Contagem Fúngica e Modificações de Lipídeos/ proteínas nos Grãos

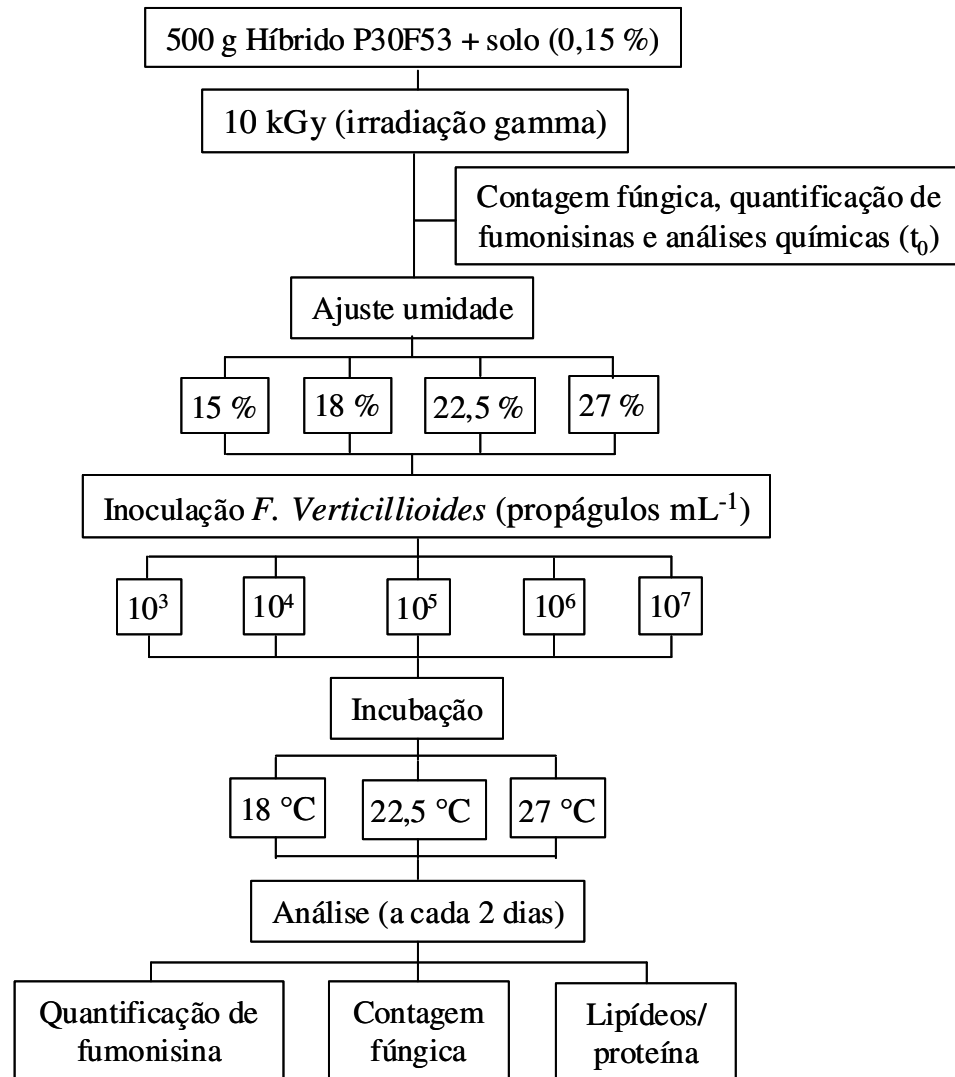


Figura 9. Procedimento operacional de cinética de produção de fumonisina, contagem fúngica e modificações de lipídeos e proteínas nos grãos de milho.

4.2.1.7 Influência da Densidade de Plantas e Doses de Nitrogênio na Cultura do Milho na Contaminação por Fumonisinas e nas Características Físico-químicas dos Grãos

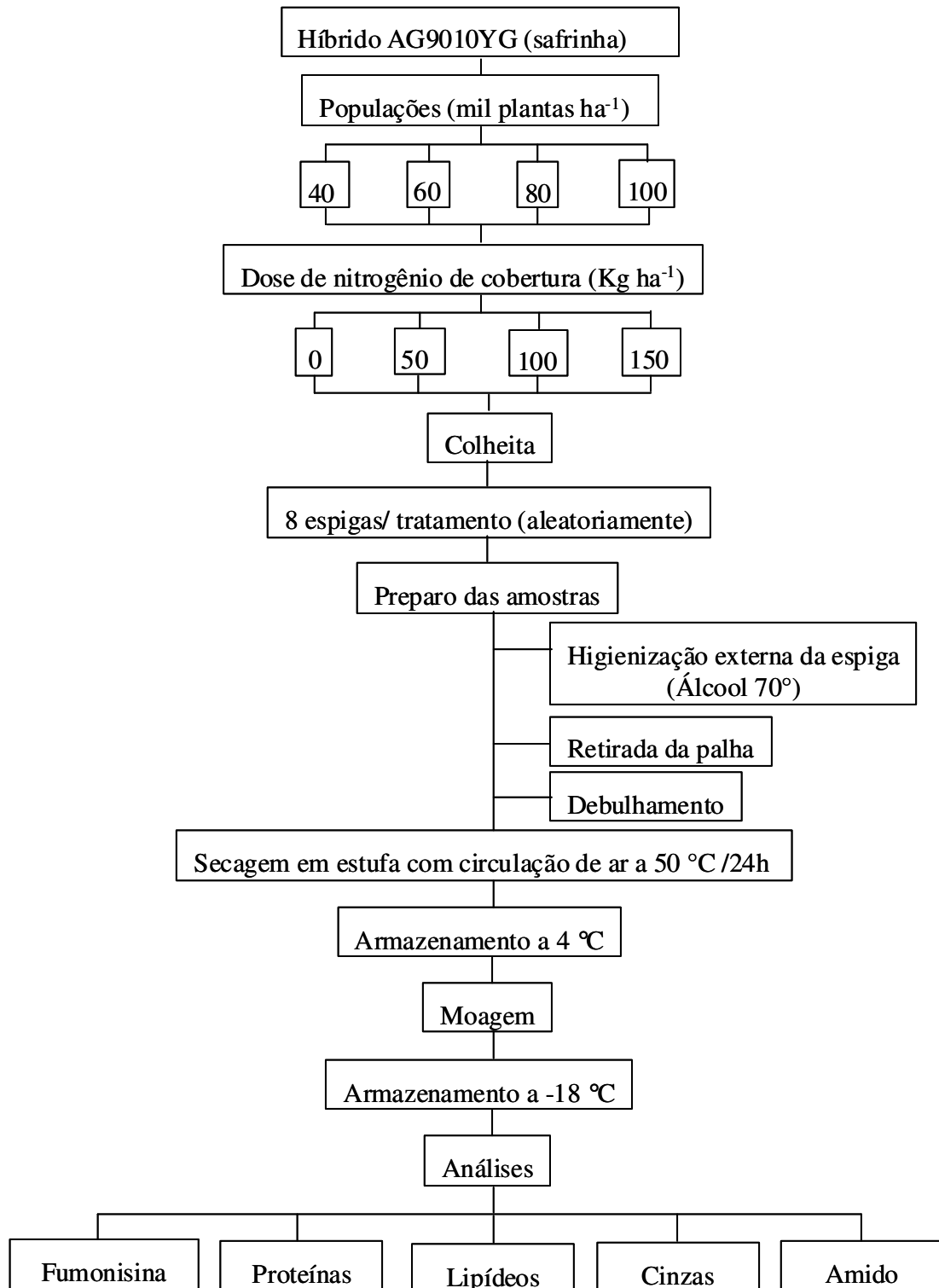


Figura 10. Procedimento operacional de densidade de plantas e doses de nitrogênio na cultura do milho na contaminação por fumonisinas e características físico-químicas dos grãos.

4.2.1.8 Influência da Inoculação a Base de *Pseudomonas fluorescens* e Adubação NPK nas Características Químicas, Contaminação Fúngica e por Fumonisinias em Grãos de Milho

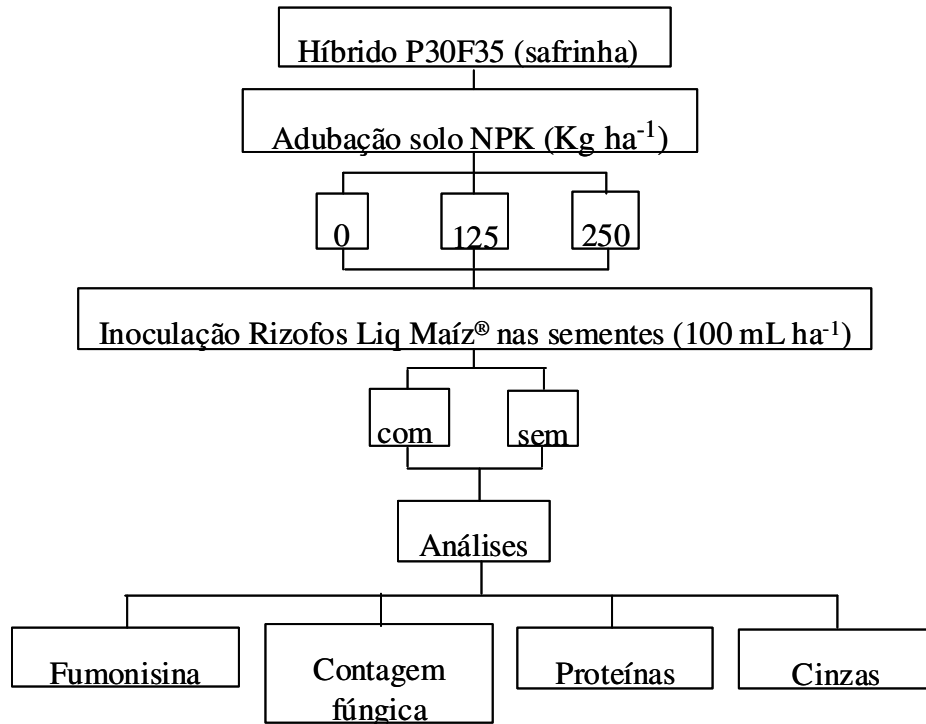


Figura 11. Procedimento operacional de inoculação a base de *Pseudomonas fluorescens* e adubação NPK nas características químicas, contaminação fúngica e por fumonisinias em grãos de milho.

4.2.1.9 Extração e Purificação de Fumonisininas

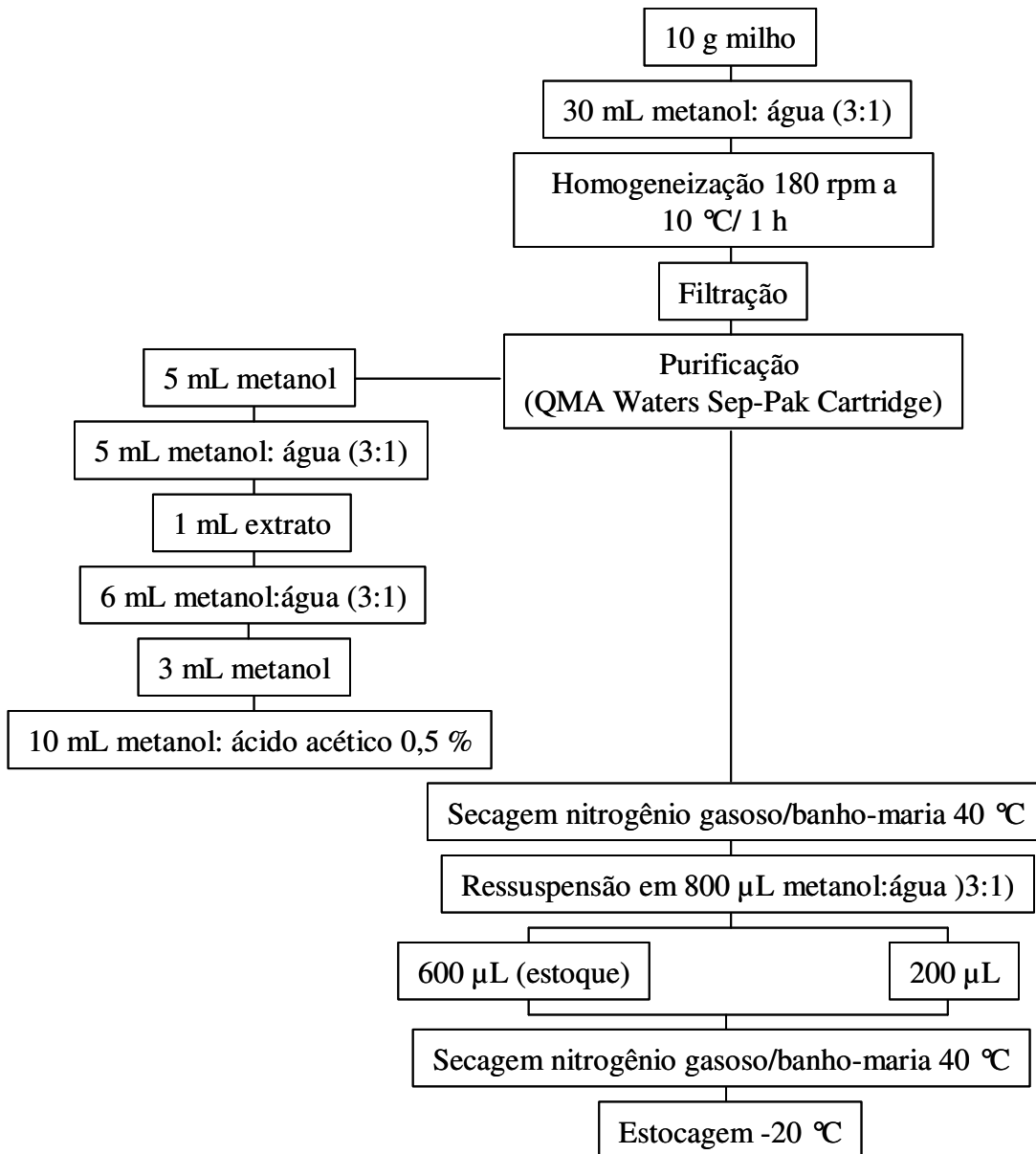


Figura 12. Extração e purificação de fumonisininas.

4.2.1.10 Quantificação de Fumonisina por CLAE

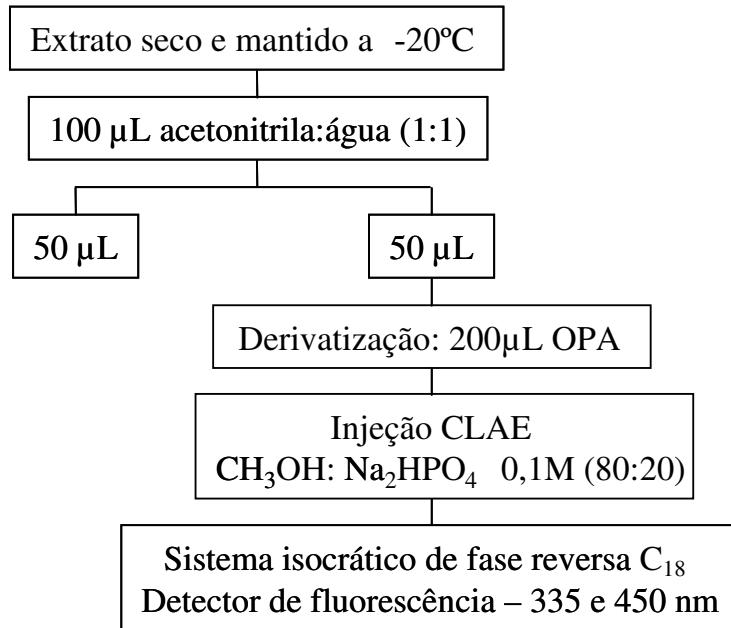


Figura 13. Quantificação de fumonisina por CLAE.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão foram condensados sob forma de artigos científicos redigidos para posterior publicação, seguindo as normas definidas pelo corpo editorial de cada periódico, para os quais foram ou serão submetidos.

5.1 VALIDATED MODELLING IN RELIABLE EXPERIMENTAL DESIGN TO STUDY THE EFFECT OF TEMPERATURE-SHOCK IN FUMONISIN PRODUCTION IN CORN

5.2 MANUTENÇÃO LABORATORIAL NA PRODUÇÃO DE FUMONISINA POR *Fusarium verticillioides* ISOLADO DE INTOXICAÇÃO ANIMAL

5.3 FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS NA PRODUÇÃO DE FUMONISINA E CRESCIMENTO DE *Fusarium verticillioides*

5.4 FUMONISIN PRODUCTION AND *Fusarium verticillioides* COUNT AS A FUNCTION OF MOISTURE CONTENT, TEMPERATURE AND INOCULUM ON CORN GRAIN OF TWO HYBRIDS

5.5 KINETICS OF FUMONISIN PRODUCTION, *Fusarium verticillioides* COUNT AND LIPIDS /PROTEINS CHANGES UNDER *in vitro* CONDITIONS ON CORN GRAINS

5.6 DENSIDADE DE PLANTAS E DOSES DE NITROGÊNIO NA CULTURA DO MILHO NA CONTAMINAÇÃO POR FUMONISINAS E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS GRÃOS

5.7 INOCULAÇÃO A BASE DE *Pseudomonas fluorescens* E ADUBAÇÃO NPK NAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS, CONTAMINAÇÃO POR FUNGOS E FUMONISINAS EM GRÃOS DE MILHO

70 "Xcrkf cvgf "o qf gmkpi "lp"tgrkcdrg"gzr gtko gpvcnlf guki p"vq"uwf {"'j g"ghge'vqh"
 vgo r gtcwtg/uj qenilkp"hwq qpklp"r tqf wevkp"lp"eqtp"

Luciana Pereira Bernd^{a*}; Thiago Montagner Souza^a; Cássia Reika Takabayashi^a; Elisabete Yurie Sataque Ono^b; Antônio Carlos Gerage^c; Osamu Kawamura^d; Yoshitsugu Sugiura^e; Elisa Yoko Hirooka^a

^aDepartment of Food Science and Technology, State University of Londrina, P.O. Box 6001, Zip Code 86051-980, Londrina, Paraná, Brazil; ^bDepartment of Biochemistry and Biotechnology, State University of Londrina, P.O. Box 6001, Zip Code 86051-980, Londrina, Paraná, Brazil; ^cAgronomical Institute of Paraná- IAPAR, Londrina, Paraná, Brazil; ^dDepartment of Biochemistry and Food Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University, Ikenobe, Miki-cho, Kita-gun, Kagawa, Japan, Zip Code 761-0765; ^eDepartment of Food Chemistry, Kobe Institute of Health, Zip Code 650-0046, Kobe, Japan.

*Correspondence to Luciana Pereira Bernd, Department of Food Science and Technology, Center of Agrarian Sciences, State University of Londrina, P.O. Box 6001, Zip Code 86051-980, Londrina, Paraná, Brazil - Phone: 55 (43) 33714565, Fax number: 55 (43) 33714080; E-mail: lucianabernd@hotmail.com

Abstract

Mathematical modelling was described in corn inoculated with *Fusarium verticillioides*, in order to evaluate the effect of moisture content (15, 20, 25%) and temperature (20, 25, 30°C) on fungal growth and fumonisins production. Performance of models developed was evaluated by graphical and mathematical/statistical validation, which indicated adequacy of coefficient, low quadratic mean error, bias/accuracy factor approximately 1, demonstrating reliability of data. The optimal condition (20°C/ 25% moisture content) established by the design was set up in corn inoculated with *F. verticillioides*, and sudden frost-condition (0;5°C) and high-temperature (40°C) were applied during incubation. Thermal shock applied at initial-incubation (2nd day) was ineffective on fumonisin production regardless of sudden temperature-shock applied. However, an increasing toxin-peak was observed, if 40°C-shock was applied after two-weeks. The models developed would be a useful tool to assure the predictive study concerning fumonisin production, and combined with metabolic understanding could contribute to improvement in strategic prevention.

Keywords: corn producing chain, mycotoxin, quality control, post-harvest.

1. Introduction

Corn (*Zea mays* L.) is a major global commodity, added as an important ingredient in many foods, and approximately 65 % is intended for animal feed (National Trade of Animal Feed Industries, 2000). Fungal contamination decreases the yield, nutritional quality, and economic value of grains, and it causes health problems due to mycotoxin production (Marín, Sanchis, Ramos, Vinas & Magan, 1998). *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (*Fusarium moniliforme* Sheldon) is the main corn phytopathogen, and the fumonisins produced as the secondary metabolites are the most concerning mycotoxins in food safety. Corn intended for human consumption and contaminated with high fumonisin levels has been associated with probable incidence of oesophageal cancer in South Africa (Rheeder, Marasas, Thiel, Sydenham, Shephard & Van Schalkwyk, 1992), China (Chu & Li, 1994; Wang, Wei, Ma & Luo, 2000), Northern Italy (Franceschi, Bidoli, Baron & la Vecchia, 1990) and Iran (Shephard, Marasas, Leggot, Yazdanpanah, Rahimian & Safavi, 2000), as well as growth reduction, heart diseases, immune deficiency, and degenerate necrosis of the liver in poultries (Ledoux, Brown, Weibking & Rottinghaus, 1992; Keck & Bodine, 2006). Recently, research has shown that maternal consumption of FB₁- contaminated corn during early pregnancy was associated with increased risk for neural tube defects in human populations that rely heavily on maize as a dietary staple (Gelineau-van Waes et al., 2009).

The high nutritional quality of corn associated with tropical and sub-tropical climates can accelerate spoilage at the pre- and post-harvest stages, particularly caused by *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. (Ominski, Marquardt, Sinhá & Abramson, 1994). The maintenance of quality in post-harvest corn has been a topic of concern in the Brazilian food producing chain due to the occurrence of *F. verticillioides* and fumonisin. Particularly in Paraná State – Brazil, which accounts for 26.5 % of the Brazilian corn production, the study targeted on this mycotoxin should be continuously followed up to assure quality (Hirooka,

Yamaguchi, Aoyama, Sugiura & Ueno, 1996; Orsi et al., 2000). In this State there are favorable field conditions for *F. verticillioides* growth, i.e., the predominantly humid subtropical climate with average temperature ranging from 14 to 22 °C, rainy hot summer, and frequent frost in fall and winter (Instituto Tecnológico SIMEPAR, 2010). Temperature slightly above 40 °C has been recorded during crop-harvest and transport, which could trigger a gradual increase in fumonisin levels due to delay in the drying process, as previously observed during a five hour interval from harvesting to drying step (Da Silva, Garcia, Vizoni, Kawamura, Hirooka & Ono, 2008).

Therefore, the study of the critical point of fumonisin production would be crucial, if the understanding is targeted on dynamic of microbial growth and secondary metabolism coupled with the intrinsic and extrinsic parameters involved in the specific environmental conditions such as temperature, water activity, pH, oxygen availability and substrate chemical composition (Dantigny, Guilmart, Bensoussan, 2005; Gould, 1989; Roberts, 1990). However, such an investigation depends on experimental design which can assure the reliability of obtained data at a level of defined and optimized *F. verticillioides* growth and fumonisin production, where the validated mathematical modeling would be a useful tool (Adair, Kilsby & Whittall, 1989; Zwietering, Cuppers, de Witt & Van T Riet, 1994).

In this study, mathematical models were set up to establish the optimum condition for fungal growth and fumonisin production in function of moisture content and temperature in corn substrate. In order to evaluate whether the fitted model was statistically acceptable for the errors inherent to the data, the constructed models were validated prior to setting up the experimental design. Thereafter, the simulation of sudden temperature-shock was inserted in the optimal condition pre-established by the model.

2. Materials and Methods

2.1. Corn Hybrid

Corn hybrid Tork (Syngenta[®]) cultivated in 2005 and 2007 crops was provided by The Agronomical Institute of Paraná (IAPAR). It was harvested in the Northern Region of Paraná state, Brazil, homogenized and maintained at 5 °C until use.

2.2. Fungal strain

Fusarium verticillioides strain 103F was isolated from corn feed involved in equine intoxication in 1991 and identified at the Science University of Tokyo, Japan. The strain was grown on potato dextrose agar (PDA) for 14 days at 25 °C. The heavily sporulated culture was suspended in sterile distilled water with 0.1 % Tween 80, and 4.64×10^4 spores g⁻¹ were inoculated on the corn grains.

2.3. Experimental Design

2.3.1. Mathematical modelling

The experiment was outlined with a full factorial design, with three repetitions at the center point, of combination of two variables at three levels (moisture – 15, 20 and 25 %; and temperature – 20, 25 and 30 °C) and one variable at two levels (*F. verticillioides* inoculum – absence and presence), totaling 22 experiments, with two replications each.

A 500 g corn sample, belonging to the 2005 crop, with 13.1 ± 0.48 % moisture content (thermally treated at 121 °C/ 15 min), was weighed in a 1000 mL Erlenmeyer flask. Sterile water was added (11.1, 43.1, and 79.3 mL, respectively) to obtain corn samples with 15, 20 and 25 % moisture content. The grains were inoculated with the *F. verticillioides* suspension

(4.67×10^4 spores g^{-1}), and the flasks, which also contained 0.15 % sterile soil (Palácios-Cabrera, Taniwaki, Menezes, Vicentini, Iamanaka & Taniwaki, 2001; Bernd et al., 2008), were incubated at 20, 25, and 30 °C for 20 days, with manual shaking every 7th day. The negative control was non-inoculated corn under the same conditions.

Fumonisin determination and fungal colony count were carried out before heat treatment (t_0) and after performing the experimental plan (20 days, t_{20}). The data for construction of the mathematical models were obtained by subtracting the values of the analysis from the two periods ($t_{20}-t_0$).

2.3.2. Simulation of drastic temperature-shock prior to drying step

Figure 1 shows the experimental design for simulation of drastic critical-conditions, where five treatments (including one control) were outlined with corn without heat-treatment, to perform simulation for drastic critical-conditions (frost and high temperature) at the post-reception step prior to drying, where corn samples (500 g each), belonging to the 2007 crop, were weighed in 1000 mL Erlenmeyer flasks and had their moisture content adjusted to 25 % by adding sterile water.

The flasks were inoculated with *F. verticillioides* suspension (4.67×10^4 spores g^{-1}) and closed with cotton tops for further simulation assays. The treatments were named as T₁, T₂, T₃, T₄ and T₅, where the control assay (T₁) was carried out with a corn sample adjusted to 25 % moisture content and incubated at 20 °C (stove type BOD) for further sampling on the 20th (t_{20}) and 30th (t_{30}) days. The same sampling schedule was performed in the other experiments, as follows. The frost temperature was simulated in treatments T₂ and T₃, where in T₂ the corn grains were kept at 0 °C for 5 days, from the second to seventh day of incubation, and in T₃, the grains were kept at 5 °C for the same period of time. The simulation

of the high-temperature shock treatments was evaluated in T₄ and T₅, where in both the temperature was increased to 40 °C, but in T₄ this increase was from the second to third day of incubation and in the T₅, from the fourteenth to the fifteenth day, during incubation at 20 °C for 20 and 30 days.

Fumonisin determination and total mould and yeast count were carried out in the samples collected at t₀, as well as at the t₂₀ and t₃₀.

2.4. Microbiological analysis – total fungal/ yeast colony count

Sub-samples (10 g) of ground corn were blended with 90 mL sterile 0.1 % peptone water (v/v), and serial dilutions were carried out with 9.0 mL of the same diluent to 10⁻⁶.

An aliquot of 0.1 mL of each dilution was plated on potato dextrose agar (PDA) and acidified to pH 4.0 with tartaric acid. The plates were incubated at 25 °C for 5 days. After the incubation period, the fungal genera were identified according to Nelson, Toussoun and Marasas (1983) and Samson, Hoeskstra and Frisvad (1995).

2.5. Fumonisin determination

Fumonisin B₁ and B₂ were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC), according to Shephard, Sydenham, Thiel and Gelderblom (1990) with some modification (Ueno et al., 1993). Fine meal preparation (50 mesh) of samples (10 g) was extracted with 30 mL methanol:water (3:1, v/v). After standing for 10 min at room temperature, the suspension was shaken at 150 r.p.m for 1 hour at 10 °C. After filtration, the extract (1.0 mL) was applied to a preconditioned Sep-Pak plus QMA (Waters Co., Ltd). After washing the cartridge with 6 mL methanol–water (3:1) followed by 3 mL methanol (J.T.

Baker, USA), fumonisins were eluted with 10 mL methanol containing 0.5 % acetic acid. The eluate was evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 40 °C, the residue was dissolved in 800 µl methanol–water (3:1) and a 200 µl aliquot dried under nitrogen. After derivatization with 200 µl O-phthaldialdehyde (OPA, Sigma Co., USA) reagent (40 mg OPA, 1 mL methanol, 5 mL 0.1M sodium borate and 50 µl 2-mercaptoethanol), high-performance liquid chromatography (HPLC) injections were made within 1 min. Fumonisins were analysed by a reversed-phase, isocratic HPLC system (Shimadzu LC-10 AD pump and RF-10A XL fluorescence detector), using a Shim-pack CLC-ODS (M) column (4.6 x 250 mm, Shimadzu). Excitation and emission wavelengths were 335 and 450 nm, respectively. The eluent was CH₃OH:0.1 M NaH₂PO₄ (J.T. Baker, USA) (80:20, v/v) adjusted to pH 3.3 with o-phosphoric acid at 1 mL min⁻¹ flow rate. The detection limits for FB₁ and FB₂ were 27.5 ng g⁻¹ and 35.3 ng g⁻¹, respectively. The recoveries of FB₁ and FB₂ from spiked corn in the range 100-400 ng g⁻¹ FB₁ and 250-450 ng g⁻¹ FB₂ averaged 106.3 % (mean CV 8 %) and 96.9 % (mean CV 10 %), respectively, based on duplicate spiking and triplicate analyses.

2.6. *Mathematical and statistical methods*

The normal data distribution was analysed by the Shapiro-Wilk W. test, while the homogeneity of variance was evaluated by the Levene test, prior to carrying out the analysis of variance (ANOVA). The coefficients of the models and their significance associated with the factors were adjusted by ANOVA. The variables of the study were moisture (X₁), inoculum (X₂), and temperature (X₃), which were codified from high (+1) to low (-1) levels. The sum of squares for pure error was calculated in order to evaluate an insignificant lack-of-fit. The dynamics of fumonisin production and fungal count were analysed by three-dimensional surfaces of models (“Statistica” software, version 5.1).

2.7. Validation

2.7.1. Mathematical / statistical validation

Mathematical and statistical indices, which included multiple correlation coefficient (R^2), mean squared error (MSE), and bias & accuracy factors, were calculated to evaluate the performance of predictive modelling of count and fumonisin production in this experimental data.

2.7.2. Graphical validation

Graphical validation was used to analyse the properties of the evaluated models. Observed fungal-count/fumonisin-production plots versus predicted fungal-count/fumonisin-production plots and the plot of normal residue distribution were examined to assess the overall reliability of the models developed.

3. Results and Discussion

3.1. Mathematical modelling

3.1.1. Initial fungal and fumonisin contamination profile in corn substrate

The corn used as substrate (Tork hybrid, 2005 crop) showed fumonisin levels ($FB_1 = 3.78 \pm 1.25 \mu\text{g g}^{-1}$; $FB_2 = 0.91 \pm 0.34 \mu\text{g g}^{-1}$) lower than the maximum limits of 5, 10, 50 and $50 \mu\text{g g}^{-1}$, which are recommended in horse, pig, cattle and poultry feeds, respectively (IARC-WHO, 2002). The fumonisin profile was also within the natural contamination level observed

in previous survey in Northern Paraná, Brazil (Ono et al., 1999). This corn substrate showed initial *Fusarium* sp. and *Penicillium* sp. count at $2.7 \times 10^5 \pm 2.0 \times 10^5$ CFU g⁻¹ and $4.3 \times 10^4 \pm 7.7 \times 10^3$ CFU g⁻¹, respectively, which can indicate the rainy and relatively low temperature exposure close to harvesting. Further overgrowth of remaining *Penicillium* sp., after thermal treatment (t_0), was probably due to heterogeneous heat distribution/ penetration into 500 g corn mass, but such a profile could simulate the corresponding field conditions with competitive microbiota.

3.1.2. Mathematical modelling for fungal count and fumonisin production

Table 1 shows the coefficients of the models developed concerning fungal count and fumonisin production, which were based on the highest value of the multiple correlation coefficient (R^2), lowest mean squared error (MSE), and non-significant lack-of-fit ($p > 0.05$), as well as the significance of associated factors. These models allowed a predictive analysis of total mould and yeast, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. count and fumonisin production projected at 20th day (t_{20}). However, its application was restricted to the levels of the parameters studied, i.e. set up at 20 to 30 °C, 15 to 25 % moisture content under 10^4 CFU g⁻¹ of *F. verticillioides*. Mathematical models concerning *Aspergillus* sp. and yeast count were not constructed, as these variable responses showed non-significant effect.

[Insert Table 1 about here]

3.1.3. Mathematical / statistical validation of the models

Table 2 shows the validation data of the mathematical/statistical analyses, which evaluated the performance of the developed mathematical models for mycoflora and fumonisin B₁, B₂, and total (FB₁ + FB₂) production in corn. The variability of the data around the center point did not differ from the variability in the experimental area in all the models, i.e., the lack-of-fit was insignificant ($p > 0.05$). The mycoflora models showed an adequate multiple correlation coefficient ($R^2 > 73\%$; Table 2), and the best model explained 98.7 % of data with the lowest residual mean for prediction of the total mould and yeast count, followed by prediction of the *Fusarium* sp. count.

The bias factor values of the three models for predicting fungal count were close to 1, corroborating good prediction capacity. The *Fusarium* sp. and *Penicillium* sp. models showed bias factors higher than 1 (1.19 and 1.23, respectively, Table 2), indicating an underestimated profile, i.e., predicted count by the models should be lower than the experimentally observed count. The model predicting the total mould and yeast count reached the best accuracy factor value, i.e. close to 1 (accuracy factor = 1.03, Table 2), an overestimated feature (bias factor value < 1 , Table 2), which indicated a safe model. The accuracy factors indicated that, on average, the predictions differed from the observed data by 24 %, 26 % and 3 % for *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., and total mould/ yeast count, respectively.

[Insert Table 2 about here]

Regarding the models developed for fumonisin production, the FB₂ model was the best, which explained 82 % of experimental data, with the lowest residual average (0.66) and bias factor value (0.94), indicating overestimation of the predicted data, i.e., a safe model (Table 2). However, this model showed the highest percentage of predictions that differed from observed data (accuracy factor = 2.02, Table 2).

3.1.4. Graphical validation of the models

Figures 2A and 2B show the observed data (fungal count and fumonisin production) versus predicted data (responses by models), followed by corresponding normal distributions of residues obtained from the respective equations.

Regarding the fungal counts (Figure 2A), the total mould and yeast count plot was the best model, when the observed-data versus predicted by model (Figure 2Aa) and the corresponding normal distribution of residues (Figure 2Ab) were analysed. That is, low residue values from adjusting experimental data, which was demonstrated by the proximity of the data-point to the equivalence line. This data agreed with the highest value of the multiple correlation coefficient (R^2) and bias /accuracy factors closer to 1 (98.7 %, 0.99, 1.03, respectively; Table 2). In contrast, the *Penicillium* sp. count plots concerning observed versus predicted by model, and corresponding distribution of residues (Figure 2Ae,f) showed data far from the equivalence line, when compared with other fungal models (Figure 2Aa,b and 2Ac,d). The fact corroborated that its accuracy factor was distanced from 1 (1.26, Table 2). Regarding the models developed for fumonisin production (Figure 2B), the data indicated an appropriate adjustment in the normal distribution of residues in the three predictive models, which were close to the equivalence line. The model concerning FB_2 indicated better predictive capacity, as its data were close to the tendency line in the experimental data versus predicted plots (Figure 2Bi, when compared with FB_1 and FB_{total} models (Figure 2Bg,l).

[Insert Figure 2 about here]

3.1.5. Effect of moisture content and temperature on *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., total mould and yeast count and fumonisin production

The highest total mould, yeast and *Fusarium* sp. count occurred in grains submitted to 25 °C under 25 % moisture content (Figure 3a,b). *F. verticillioides* grew better at 25 °C when compared to 20 °C and 15 °C, whereas the growth decreased at 30 °C (Alberts, Gelderblom, Thiel, Marasas, Van Schalkwyk & Behrend (1990) and Velluti, Marín, Bettucci, Ramos & Sanchis (2000)). The moisture content affected the *Fusaria* growth more than temperature and the last parameter in the developed mathematical model exerted a non-significant effect ($p > 0.05$, Table 1). This fact can be observed in the fungal count model coefficients (Table 1), which showed higher absolute numerical values of moisture in the linear term, compared to the temperature ($X_1 = 2.867$, total mould and yeast count model; $X_1 = 1.698$, *Fusarium* sp. model; $X_1 = 3.624$, *Penicillium* sp. model, $p < 0.01$; Table 1). The positive sign of these coefficients indicated a directly proportional relationship of moisture content with fungal growth, agreeing with Figure 3a,b.

Regarding fumonisin, the highest production occurred in corn under 25 % moisture content at 20 °C (Figure 3c,d). Emphasis should be targeted particularly on change of affecting parameter, when compared with optimum *Fusarium* sp. growth. Contrasting with the fungal growth data (Table 1, Figure 3a), the temperature was the independent variable that affected the fumonisin production more than moisture content ($p < 0.05$, Table 1). According to Table 1, the temperature X_3 in linear term of the developed model showed a higher absolute numerical coefficient, when compared with moisture content X_1 , and their significances p (FB₁ model: $X_3 = -5.930$, $p < 0.01$ and $X_1 = 2.762$, $p < 0.05$; FB₂ model: $X_3 = -1.356$, $p < 0.001$ and $X_1 = 0.470$, non-significant; FB_{total} model: $X_3 = -5.374$, $p < 0.01$ and $X_1 = 3.900$, $p <$

0.05). The negative sign of temperature coefficients indicated an inverse relationship of this variable with fumonisin production, agreeing with Figure 3c,d.

Such a data suggested that factors essentially involved in growth, such as water activity, could play a less important role in toxin biosynthesis at the stationary phase. In contrast, factors such as climatic conditions, transport and drying processes could drastically change the condition of the exposed grain, which can trigger the gene expression involved in secondary metabolism (thermal shock, cutting the supply of nutrients by harvesting, disruption of natural defence mechanisms and physiological processes of the plant).

[Insert Figure 3 about here]

3.2. Effect of thermal shock on optimal fumonisin production established by modelling

Simulation of drastic temperature-shock prior to the drying step was carried out on *F. verticillioides* 103F growth, where the optimal fumonisin production (20 °C / 25 % moisture) had been established by modelling (Figure 3c,d). Short-time temperature treatments simulated the sporadic but drastic interference of climatic condition, which could occur prior to the drying step. Such a drastic temperature change can be frequent in the current major corn producing fields in Brazil (Instituto Tecnológico SIMEPAR, 2010). The experimental design was set up in naturally-contaminated corn (2007 crop sample) inoculated with strain 103F, and sudden frost-condition (0; 5°C), as well as high-temperature (40 °C) was applied during 30 days continuous optimal incubation (Figure 1).

The initial profile of naturally-contaminated corn (t_0) showed a total mould and yeast count of 9.1×10^5 CFU g⁻¹, with 3.99 µg g⁻¹ FB₁ and 2.12 µg g⁻¹ FB₂. Therefore, *Fusarium* sp.

count and fumonisin profile were similar to the grains harvested in the 2005 crop, in which the mathematical modeling was developed (Table 1).

Figure 4 compares the overall fungal counts versus fumonisin data at the two endpoints t_{20} and t_{30} of the treatments T_1 to T_5 . There was a gradual increase in the *Fusarium* sp. count from 1.6×10^5 to 1.3×10^7 CFU g^{-1} (t_{20}) and 8.5×10^5 to 1.1×10^7 CFU g^{-1} (t_{30}). However, emphasis should be targeted on increased fumonisin level in treatment T_5 when compared with T_1 to T_4 data, i.e., FB_{total} from 4.4 to 11.9 $\mu g g^{-1}$ at t_{20} and then from 8.0 to 40.7 $\mu g g^{-1}$ at t_{30} . The data also indicated that the application of the same thermal shock time, but performed at different stages of a constant incubation design, can result in different fumonisin production (40 °C, T_4 versus T_5). Therefore, Figure 4 shows that in simulating an experiment of high temperature-shock (40 °C), an increased toxin peak of 40.7 $\mu g g^{-1}$ occurred if a sudden 40 °C-shock was applied after two-weeks growth at optimal condition (at 14th-15th day, T_5), but not at the initial incubation (8.3 $\mu g g^{-1}$, 2nd-3rd day, T_4). Regarding the fungal growth, any trend can be defined from projected graphics.

[Insert Figure 4 about here]

The developed modeling data (Figure 3a and Table 1) corroborated with the report on increased *F. verticillioides* at 25 °C (Alberts et al., 1990; Velluti et al., 2000); when corn was incubated at 30 °C, these authors reported reduction in growth, as well as toxin production (Dilkin, Mallmann, Almeida, Stefanon, Fontana & Milbradt, 2002). Thus, in spite of decreased *Fusarium* sp. growth and fumonisin production at constant 30 °C, the data shown in Figure 4 suggested the awareness concerning increase / decrease of temperature due to climatic shock on mature corn in the field, near the post-harvest or drying stage, which can induce fumonisin production. The artificial drying of grain frequently uses temperatures

above 40 °C (Portella & Eichelberger, 2002). In addition, a common post-harvest practice used in grains with moisture levels ranging from 25 to 35 % has been drying in warehouses with forced hot air for 48 to 72 hours to reach 13 % moisture content (Villela & Silva, 1992). Such a drying practice combined with air temperature above 40 °C may trigger the secondary metabolism.

The T₄ showing low-interference in fumonisin level when 40 °C-shock was applied at early incubation (2nd-3rd day) indicated that fungal growth was probably at the lag-phase involving the enzyme induction of secondary metabolism. Sudden increase in fumonisin production at late incubation (40 °C at 14th-15th day, T₅) suggested a prior adaptation – stationary phase of growth. The physiologically mature grains exposed to stressful conditions in field, followed by the transport and pre-drying stage, showed non-significant alteration in fungal count (da Silva et al., 2008), but such factors were probably favorable to triggering the fumonisin production. Regarding the ineffective effect of low-temperature applied at early incubation (0 and 5 °C, T₂ and T₃, Figure 4), further investigation should be performed using late-incubation at low temperature experimental design.

4. Conclusion

The adjusted models would be useful tools to assure the conditions in fungal growth and fumonisin production data, improving the understanding of variables involved in the corn producing chain. The study concerning temperature-shock at different stages of incubation under conditions pre-established by the models would allow further studies which should be conducted amplifying the investigation parameters.

5. Acknowledgements

The authors thank the CNPq (the Brazilian Government organization for grant aid and fellowship to Brazilian researchers) in association with MAPA (Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply, the Araucária Foundation (Paraná State grant), Paraná Fund/SETI and CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) – Nanobiotechnology Network Program (04/CII-2008) for financial support. The CNPq/Pq Scholarship is greatly appreciated by E.Y.S.Ono and E.Y.Hirooka.

6. References

- Adair, C., Kilsby, D. C., & Whittall, P. T., (1989). Comparison of the Schoolfield (non-linear Arrhenius) model and the Square Root model for predicting bacterial growth in foods. *Food Microbiology*, 6(1), 7-18.
- Alberts, J. F., Gelderblom, W. C. A., Thiel, P. G.; Marasas, W. F. O., Van Schalkwyk, D. J., & Behrend, Y. (1990). Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme*. *Applied Environmental Microbiology*, 56(6), 1729-1733.
- Bernd, L.P., Curioni, A.A., Basso, F., Furlong, E.B., Ono, E.Y.S., Gerage, A.C., & Hirooka, E. Y. (2008). Modelagem matemática para fumonisininas em milho e perfil cromatográfico de metabólitos produzidos por *Fusarium verticillioides*. *Semina: Ciências Agrárias*, 29(2), 361-378.
- Chu, F. S., & Li, G. Y. (1994). Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ 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*, 60(3), 847-852.

- Da Silva, M., Garcia, G. T., Vizoni, É., Kawamura, O., Hirooka, E. Y., & Ono, E. Y. S. (2008). Effect of the time interval from harvesting to the pre-drying step on natural fumonisin contamination in freshly harvested corn from the State of Paraná, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 25(5), 642–649.
- Dantigny, P., Guilmart, A., & Bensoussan, M. (2005). Basis of predictive mycology. *International Journal of Food Microbiology*, 100 (1-3), 187-196.
- Dilkin, P., Mallmann, C. A., Almeida, C. A. A., Stefanon, E. B., Fontana, F. Z., & Milbradt, E. L. (2002). Productions of fumonisins by strains of *Fusarium moniliforme* according to temperature, moisture content and growth period. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(2), 111-118.
- Franceschi, S., Bidoli, E., Baron, A. E., & la Vecchia, C. (1990). Maize and risk of cancers of the oral cavity, pharynx and esophagus in Northeastern Italy. *Journal of National Cancer Institute*, 82(17), 1407–1411.
- Gould, G. Predictive mathematical modeling of microbial growth and survival in foods. *Food Science Technology Today*, 3, 80-92, 1989.
- Hirooka, E. Y., Yamaguchi, M. M., Aoyama, S., Sugiura, Y., & Ueno Y. (1996). The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. *Food Additives and Contaminants*, 13(2), 173-183.
- Instituto Tecnológico SIMEPAR. Disponível em: www.simepar.br. Acesso em: 12 abr, 2010.
- International Agency for Research on Cancer – World Health Organization (IARC-WHO). (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and atyrene. In *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human*, vol. 82 (pp. 301). Lyon: IARC Working Group, World Health Organization.
- Keck, B. B., & Bodine, A. B. (2006). The effects of fumonisin B₁ on viability and mitogenic response of avian immune cells. *Poultry Science*, 85(6), 1020–1024.

- Ledoux, D. R., Brown, T. P., Weibking, T. S., & Rottinghaus, G. E. (1992). *Fusarium* toxicity in broiler chicks. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4(3), 330-333.
- Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A. J., Vinas, I., & Magan, N. (1998). Environmental factors, *in vitro* interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycology*, 102(7), 831-837.
- National Trade of Animal Feed Industries, National Association of Animal Feed Manufacturers, (2000). *Perfil da Indústria Brasileira de alimentação animal* (pp.8). São Paulo.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., & Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium species: an illustrated manual for identification*. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania.
- Ominski, K. H., Marquardt, R. R., Sinhá, R. N., & Abramson, D. (1994). Ecological aspects of count and mycotoxin production by storage fungi. In: J.D. Miller, H.L. Trenholm, *Mycotoxins in grains compounds other than aflatoxin*, (pp. 287-312). USA: Eagan Press.
- Ono, E. Y. S., Sugiura, Y., Homechin, M., Kamogae, M., Vizzoni, E., Ueno, Y., & Hirooka, E. Y. (1999). Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil. *Mycopathologia*, 147(3), 139-148.
- Orsi, R. B., Corrêa, B., Possi, C. R., Schammass, E. A., Nogueira, J. R., Dias, S. M. C., & Malozzi, M. A. B. (2000). Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. *Journal of Stored Products Research*, 36(1), 75-87.
- Palacios-Cabrera, H. A., Taniwaki M. H., Menezes, H. C., Vicentini, M. C., Iamanaka, B. T., & Taniwaki, N. N. (2001). Optimisation of the inoculation of *Aspergillus ochraceus* in coffee for isothermal studies simulating storage and marine transport of raw coffee. 19th ASIC Coffee Conference, Trieste, Italy, 14-18 May.

- Portella, J. A., & Eichelberger, L. (2001). *Secagem de grãos*. Passo Fundo: Embrapa Trigo.
- Rheeder, J. P., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Sydenham, E. W., Shephard, G. S., & Van Schalkwyk, D. J. (1992). *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human oesophageal cancer in Transkei. *Phytopathology*, 82(3), 353–357.
- Roberts, T. A. (1990). Predictive modeling of microbial growth In A Turner (Ed). *Food Technology International Europe*, Sterling publications International, London, p. 231-235.
- Samson, R. A., Hoeskstra, E. S., & Frisvad, J. C. (1995). *Introduction to food-borne fungi*. 4 ed. The Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Shephard, G. S., Marasas, W. F., Leggot, N. L., Yazdanpanah, H., Rahimian, H., & Safavi, N. (2000). Natural occurrence of fumonisins in corn from Iran. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 1860–1864.
- Shephard, G. S., Sydenham, E. W., Thiel, P. G., & Gelderblom, W. C. A. (1990). Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography*, 13(10), 2077-2087.
- Ueno, Y., Aoyama, S., Sugiura, Y., Wang, D. S., Hirooka, E. Y., Hara, S., Karki, T., Chen, G., & Yu, S. H. (1993). A limited survey of fumonisin in corn and corn-based products in Asian countries. *Mycotoxin Research*, 9(1), 27-34.
- Velluti, A., Marín, S., Bettucci, L., Ramos, A. J., & Sanchis, V. (2000). 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*, 59(1-2), 59-66.
- Villela, F. A., & Silva, W. R. da. (1992). Curvas de secagem de sementes de milho utilizando o método intermitente. *Scientia Agrícola*, 1(49), 145-153.

- Zwietering, M. H., Cuppers, H.G.S.M., De Witt, J. C., & Van T Riet, K. (1994). Evaluation of data transformations and validation of a model for the effect of temperature on bacterial growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(1), 195-203.
- Gelineau-van Waes, J., Voss, K. A., Stevens, V. L., Speer, M. C., & Riley, R. T. (2009) Maternal Fumonisin Exposure as a Risk Factor for Neural Tube Defects. *Advances in Food and Nutrition Research*, 56, 145-181.
- Wang, H., Wei, H., Ma, J., & Luo, X. (2000). The fumonisin B₁ content in corn from North China, a high-risk area of oesophageal cancer. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 19, 139-141.

Table 1. Coefficients of fungal count and fumonisin production models

	Total moulds and Yeast		FB₁	
Constant	7.7416 ± 0.1438	***	3.233 ± 1.223	*
Linear terms (X)				
X ₁	2.8675 ± 0.1761	***	2.762 ± 1.116	*
X ₂			1.320 ± 1.402	---
X ₃	0.3516 ± 0.1017	***	-5.930 ± 1.933	**
Quadratic terms (X ²)				
X ₁	-1.9191 ± 0.2274	***		
X ₃	-0.8891 ± 0.2274	***	2.896 ± 1.655	---
Product of terms (X.X)				
X ₁ ² · X ₂	0.0883 ± 0.1017	**	-3.027 ± 1.718	---
X ₁ · X ₃	0.3237 ± 0.1245	**	-3.766 ± 1.367	*
X ₁ · X ₃ ²	0.9887 ± 0.2157	***		
X ₁ ² · X ₃			2.868 ± 2.638	---
X ₁ ² · X ₃ ²	-1.0770 ± 0.3134	***		
X ₂ · X ₃			-2.684 ± 1.116	*
X ₂ · X ₃ ²			2.637 ± 1.718	---
	<i>Fusarium sp.</i>		FB₂	
Constant	3.9957 ± 0.2332	***	1.240 ± 0.257	***
Linear terms (X)				
X ₁	1.6983 ± 0.1856	***	0.470 ± 0.406	---
X ₂	3.6563 ± 0.2332	***	0.261 ± 0.294	---
X ₃	0.0833 ± 0.1856	---	-1.356 ± 0.234	***
Quadratic terms (X ²)				
X ₁	-1.1444 ± 0.2856	**		
X ₃	-0.9044 ± 0.2856	**	0.805 ± 0.348	*
Product of terms (X.X)				
X ₁ · X ₂	1.6983 ± 0.1856	***	0.395 ± 0.234	---
X ₁ ² · X ₂	-0.9392 ± 0.2856	**	-0.618 ± 0.361	---
X ₁ · X ₃			-1.298 ± 0.287	***
X ₁ · X ₃ ²			1.001 ± 0.497	---
X ₂ · X ₃			-0.781 ± 0.234	**
X ₂ · X ₃ ²	-0.6992 ± 0.2856	*	0.504 ± 0.361	---
	<i>Penicillium sp.</i>		FB_{total}	
Constant	6.3520 ± 0.5490	***	4.473 ± 1.435	**
Linear terms (X)				
X ₁	3.6241 ± 0.5012	***	3.900 ± 1.310	*
X ₂	-0.5968 ± 0.3702	---	1.581 ± 1.647	---
X ₃			-5.374 ± 1.310	**
Quadratic terms (X ²)				
X ₁	-1.7961 ± 0.7434	*		
X ₃			3.701 ± 1.944	---

*significant P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; --- non-significant

X₁ = moisture (15 – 25 %); X₂ = *F. verticillioides* (without inoculum - 10⁴ propagules g⁻¹); X₃ = temperature (20 – 30 °C); t₂₀.

Table 2. Validation indices for the performance of models for fungal count and fumonisin production

Model (Y)	MSE*	Lack-of-fit ("p")	R ² (%)	Bias factor	Accuracy factor
Total moulds / yeasts	0.121	0.337	98.7	0.99	1.03
<i>Fusarium</i> sp.	0.4134	0.460	96.7	1.19	1.24
<i>Penicillium</i> sp.	3.0150	0.9869	73.3	1.23	1.26
FB ₁	14.957	0.1729	61.8	0.75	1.74
FB ₂	0.661	0.4866	82.0	0.94	2.02
FB _{total}	20.618	0.2238	67.9	1.02	1.99

*MSE: mean squared error

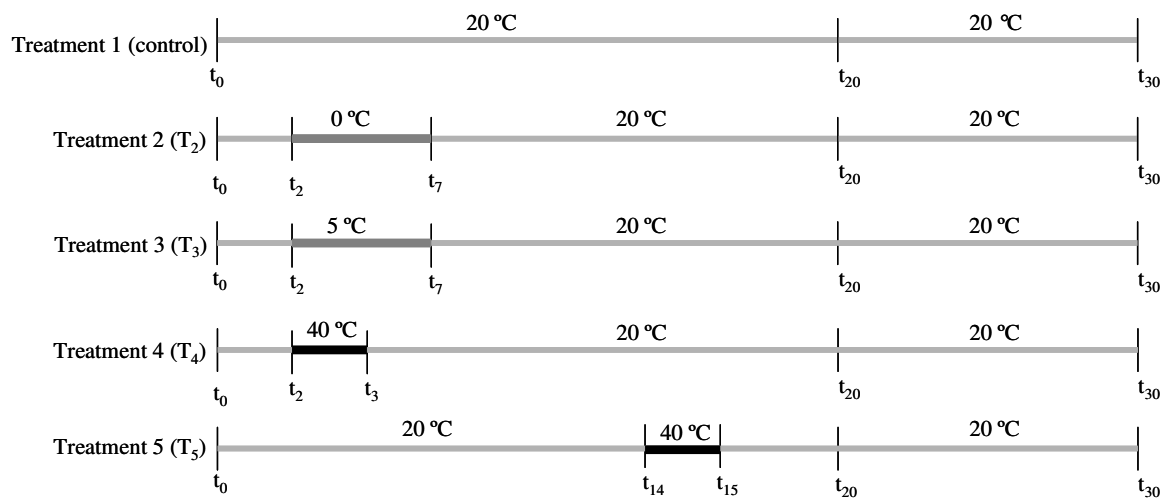


Figure 1. Experimental design to simulate the drastic temperature conditions prior to the drying step in natural fresh corn (inoculated with *F. verticillioides* 103F and incubated at optimal condition for fumonisin production determined by mathematical modelling – 20 °C and 25 % moisture content).

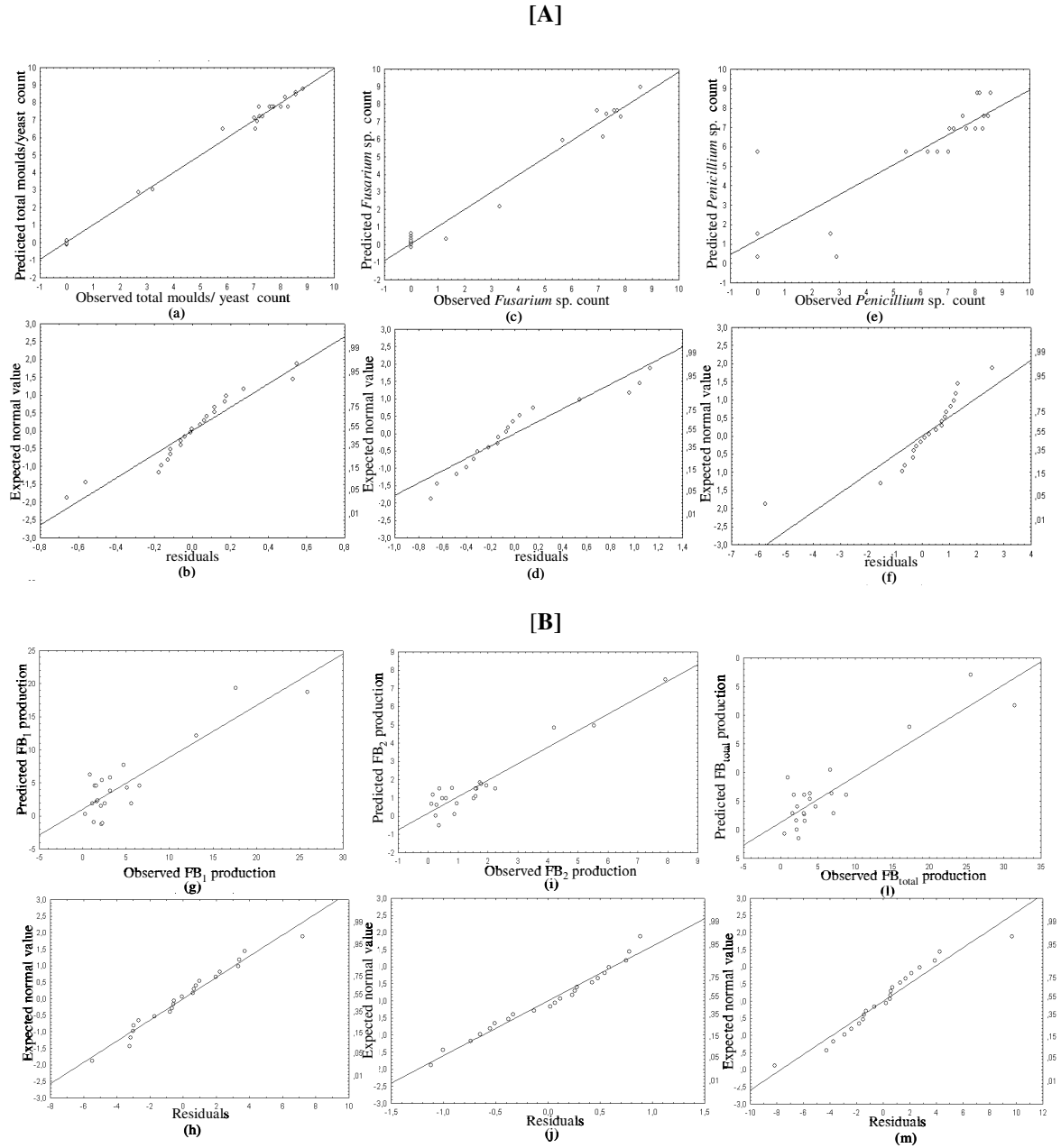


Figure 2. [A] - Observed data versus predictive responses by models and respective of model plot residues concerning fungal counts: total moulds and yeasts (a/b), *Fusarium* sp. (c/d) and *Penicillium* sp. (e/f). [B] - Observed data versus predictive responses by models and respective model plot residues concerning fumonisin production: FB_1 (g/h), FB_2 (i/j) and FB_{total} (l/m).

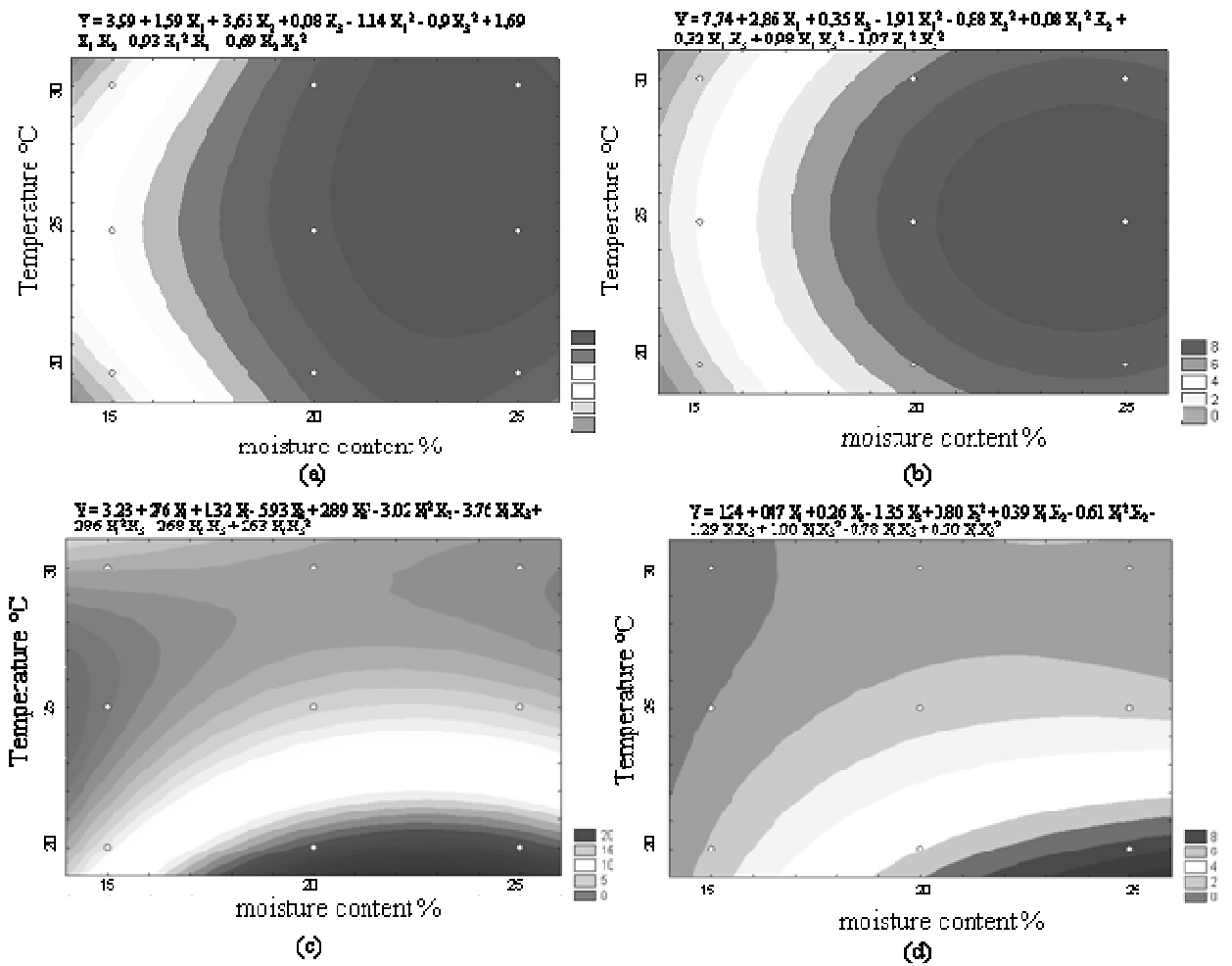


Figure 3. Contour plot of moisture content (15, 20, and 25 %) versus temperature (20, 25, and 30 °C) on total mould and yeast growth (a), *Fusarium sp.* growth (b), fumonisins FB₁ (c) and FB₂ (d) production.

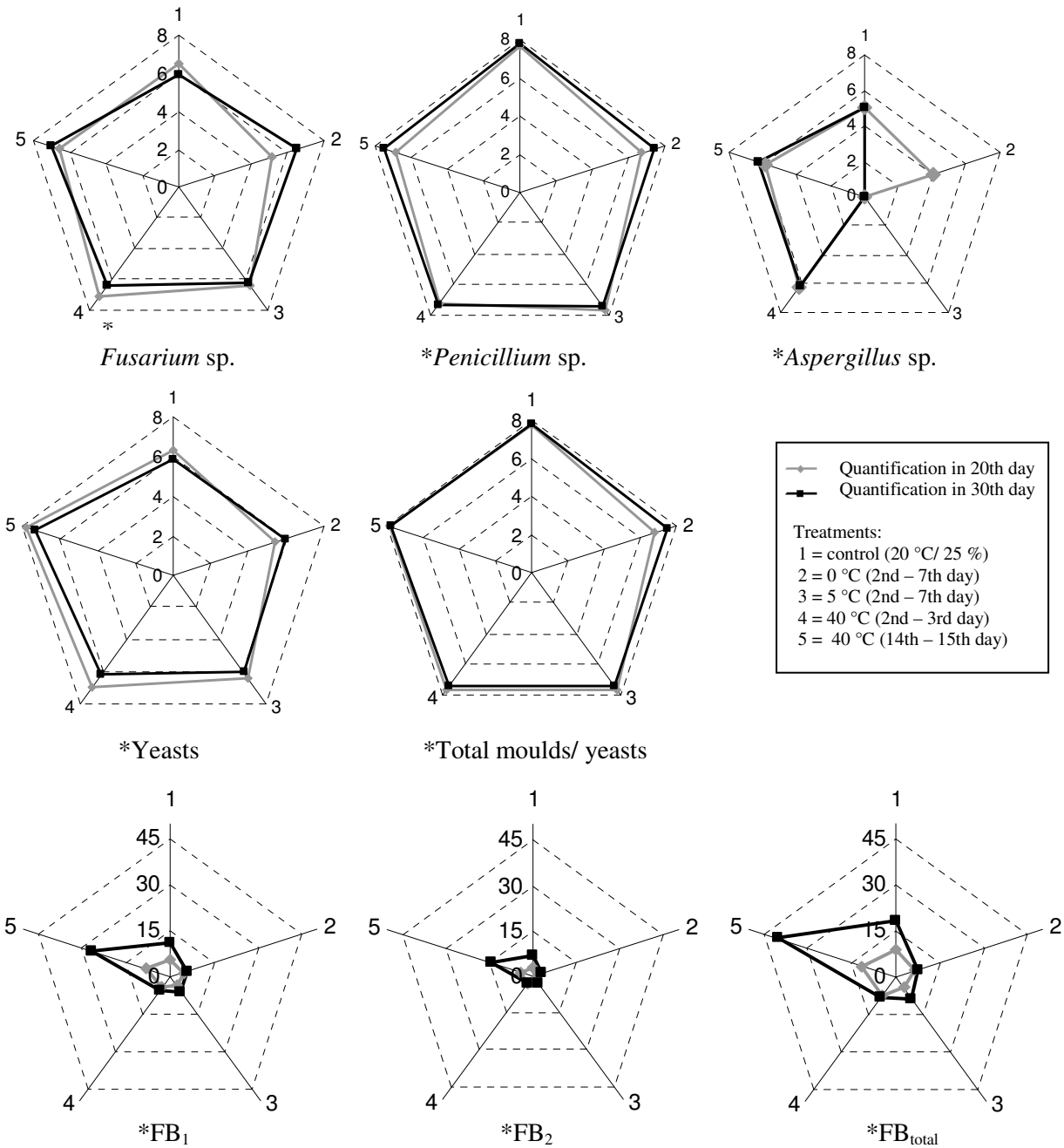


Figure 4. Fungal count and fumonisin levels on the 20th and 30th days of incubation in treatments 1 (20 °C during all the experiment), 2 (0 °C, from the second to seventh day of incubation), 3 (5 °C, from the second to seventh day of incubation), 4 (40 °C, from the second to third day of incubation) and 5 (40 °C, from the fourteenth to fifteenth day of incubation).

70" O cpwgp± q" rcdqtevtken' pc" r tqf w± q" f g" hwo qpklpc" r qt" Hwuctkwo " xgt vektqkf gu"
 kuqrf q' f g' lpvzkec± q" cpko cn""

Laboratory maintenance in fumonisin production by *Fusarium verticillioides* isolated from animal intoxication

LUCIANA PEREIRA BERND¹; ANGÉLICA TIEME ISHIKAWA¹; THIAGO MONTAGNER SOUZA¹, ANTÔNIO CARLOS GERAGE²; ELISABETE YURIE SATAQUE ONO³; ELISA YOKO HIROOKA¹

RESUMO

Fumonisinas produzidas por *Fusarium verticillioides*, patógeno primário de milho, desencadeiam patologias em humanos e animais. O trabalho teve como objetivo avaliar a toxigenicidade (produção de fumonisinas) em cinco cepas de *F. verticillioides* (103F, 113F, 119B, 119BR e 97K) submetidas a constantes repicagens desde o isolamento, com datas de repicagem no período de estocagem de 1991 a 2007. Os sub-cultivos (20 cepas) foram reativados em meio ágar batata dextrose e a toxigenicidade avaliada em substrato milho incubando-se a 25 °C por 15 dias. No decorrer destes anos de repicagem-estocagem, *F. verticillioides* testadas mantiveram produção de níveis detectáveis de fumonisina, sendo que 90 % das cepas produziram FB₁ (0,28 a 2610,6 µg g⁻¹) e 85 %, FB₂ (0,03 a 781,1 µg g⁻¹); duas cepas apresentaram-se negativas perante produção de fumonisinas. Não obstante, o decréscimo drástico na toxigenicidade das cepas sugere o efeito de repicagens aliado à estocagem das cepas na expressão de enzimas envolvidas na biossíntese de metabólitos secundários, indicando a necessidade de avaliar as características das culturas antes de proceder qualquer ensaio experimental toxicológico.

Palavras-chave: Fumonisinas, *Fusarium verticillioides*, cepas, milho.

ABSTRACT

Fumonisins produced by *Fusarium verticillioides* are responsible for causing diseases in humans and animals. The study aimed to evaluate the total production of fumonisins (FBt) in 5 strains of *F. verticillioides* (103F, 113F, 119B, 119BR e 97K), which had been constantly subcultured from 1991 to 2007. Subcultures were grown in potato dextrose agar and toxigenicity evaluated in corn substrate incubating at 25 °C during 15 days. Values found ranged from N.D.- 1259.1 µg g⁻¹ and N.D. – 514.02 µg g⁻¹ range of FB₁ and FB₂, respectively; two strains lost the capacity to produce fumonisin. The great difference found in the toxin production by different strains may be related to mutations due to long storage time and the constant plating. Evaluation of strains characteristics is necessary to experimental toxicological tests.

Key words: Fumonisins, *Fusarium verticillioides*, strains, corn.

¹ Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ CCA/ UEL, Londrina/PR. Cx. Postal: 6001, CEP: 86051-980, Londrina, PR - Telefone: (43) 99255038; E-mail: lucianabernd@hotmail.com. Artigo.

² Instituto Agrônômico do Paraná – IAPAR, Londrina, PR, Brasil.

³ Depto. de Bioquímica e Biotecnologia/ CCE/ UEL, Londrina, PR, Brasil.

INTRODUÇÃO

A conservação da viabilidade e das características morfológicas e fisiológicas é um requisito fundamental na preservação de microrganismos. Os fungos filamentosos em cultivo sob constante repicagem apresentam uma elevada tendência para a mudança espontânea, seja morfológica (setorização, por exemplo) ou fisiológica (produção de metabólitos secundários), provavelmente relacionada às condições de cultura, aliados ao número de gerações (SANTOS *et al.*, 2002).

Inúmeros métodos disponíveis para a conservação microbiana dependem da natureza do organismo e sua futura utilização (RYAN *et al.*, 2002). Os critérios para a escolha do método de conservação de uma coleção fúngica dependem da estrutura e recursos disponibilizados pelo laboratório, e também de uma avaliação prévia dos microrganismos de interesse, uma vez que estes apresentam diferentes comportamentos frente aos diversos meios de preservação. Dentre os métodos de conservação, citam-se os repiques sucessivos em meio de cultura para manter a viabilidade celular. Todavia, as múltiplas transferências afetam a integridade genética original e, muitas características podem ser modificadas ou perdidas por mutação (AZEVEDO, 1991).

Tradicionalmente, a avaliação rotineira de cultura fúngica em estoque envolve estimativa da viabilidade, observação das características morfológicas e fisiológicas, com atenção especial à manutenção da toxigenicidade, devido à importância em pesquisas referentes à segurança alimentar. Entre os fungos micotoxigênicos da cadeia produtiva de milho, o *Fusarium verticillioides* destaca-se na pós-colheita nas imediações da fase de pré-secagem, por gerar perdas no rendimento, valor nutricional, além de qualidade fitossanitária devido a produção de fumonisinas (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997).

A infecção por *Fusarium* spp. em milho e a contaminação por fumonisinas são influenciadas por diferentes parâmetros, incluindo condições ambientais (clima, temperatura,

umidade), ataque por insetos e manipulação do produto pré e pós-colheita (SWEENEY & DOBSON, 1998; FANDOHAN, HELL, MARASAS, 2003).

Fumonisinias produzidas por *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. nygamai* e *Alternaria* spp. são toxinas de caráter polar com fórmula empírica de $C_{34}H_{59}NO_{15}$, contendo diéster de propano-1,2,3-ácido tricarboxílico e 2-amino-12,16-dimetil-3,5,10,14,15-pentahidroieicosano (BEZUIDENHOUT *et al.*, 1988). Os 28 análogos de fumonisinias isolados e caracterizados enquadram-se em categorias A, B, C e P, sendo que o análogo B (FB) compreende as três fumonisinias de importância toxicológica (FB₁, FB₂ e FB₃). A FB₁ corresponde a 70 a 80 %, FB₂ de 15 a 25 % e FB₃ de 3 a 8 % do total de fumonisinias produzidas em milho, arroz ou meio líquido (RHEEDER, MARASAS, VISMER, 2002). A fumonisinina é classificada no grupo 2B, ou seja, possíveis carcinógenas ao homem pela *Internacional Agency for Research on Cancer* (IARC, 1993) e, tem sido relacionada a provável câncer esofágico em Transkei (África do Sul), China e norte da Itália (FAO, 2001). Na patologia animal, a fumonisinina tem sido responsável pela leucoencefalomalácia eqüina (SYDENHAM *et al.*, 1992), edema pulmonar em suínos, hepatocarcinogenicidade e hepatotoxicidade em ratos (GELDERBLOM *et al.*, 2004), carcinogenicidade em roedores (VOSS *et al.*, 2002), redução da viabilidade e atividade fagocítica de macrófagos em aves (CHATTERJEE; MUKHERJEE, 1994).

O presente estudo analisou a produção de fumonisinina (FB₁ e FB₂) em cinco cepas de *F. verticillioides* isoladas em 1991 de ração animal, submetidos a sucessivos subcultivos, com diferentes datas de reativação para nova estocagem até o ano de 2007.

MATERIAL E MÉTODOS

Substrato

O substrato utilizado para avaliar a toxigenicidade consistiu de milho híbrido simples P30F53 (Pioneer®), cultivado na safra 2007, disponibilizado pelo Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR-PR).

Fusarium verticillioides

F. verticillioides cepas 97K (1 cepa), 103F (14 cepas), 113F (3 cepas), 119B (1 cepa) e 119BR (1 cepa) com datas de repique entre 1991 a 2007, pertencentes à coleção de cepas do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina (UEL), foram originalmente isoladas de rações envolvidas em surtos de intoxicação animal no ano de 1991 no Estado do Paraná.

Procedimento operacional

As cepas de *F. verticillioides* foram isoladas de rações animais em 1991, empregando ágar peptona pentacloronitrobenzeno (PPA, NASH; SNYDER, 1962), ágar peptona dichloran cloranfenicol (DCPA, ANDREWS; PITT, 1986) e PCNB 2-amino butano (PAB, JEFFERIS; BOYD, 1984). Volume de 0,5 mL da suspensão de ração diluída em água peptonada 0,1 % (10^{-1} a 10^{-4}) foi plaqueada na superfície de ágar em duplicata e, 5 a 10 colônias representativas de *Fusarium* sp. em cada plaqueamento foram transferidas para tubo contendo ágar batata dextrose inclinado, para proceder cultura monoespórica. A cepa oriunda da cultura monoespórica foi inoculada em *carnation leaf* ágar - CLA (FISHER *et al.*, 1982), selecionando-se 42 cepas para prosseguir com identificação microscópica (NELSON *et al.*, 1983). A toxigenicidade de cepa foi avaliada imediatamente inoculando-se 10^6 propágulos mL^{-1} em placa de Petri (90 x 20 mm) contendo 10 g de milho triturado e 10 mL de água destilada, submetidos previamente a duas autoclavagens (121 °C/30 min). As culturas foram incubadas a 25 °C por duas semanas e a fumonisina quantificada por CLAE. Ao longo dos

anos seguintes, as mesmas cepas reativadas-ropicadas permaneceram a 4 °C no meio água batata dextrose. Vinte destes sub-cultivos foram ativados em 2007 em ágar batata dextrose inclinado a 25 °C por 15 dias e, a produção de fumonisina avaliada conforme efetuado no ano de 1991, exceto o cultivo das placas de Petri que foram substituídas por frasco erlenmeyer de 100 mL.

Determinação de Fumonisinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A determinação de fumonisinas foi realizada por CLAE de acordo com a metodologia descrita por Shephard *et al.* (1990), modificada por Ueno *et al.* (1993). Para extração, um volume de 30 mL de metanol: água (3:1, v:v) foi adicionado a 10 g de amostra triturada (50 mesh), seguido de agitação a 150 r.p.m. por 1 hora a 10 °C (incubadora refrigerada Marconi®). Após filtração, foi aplicado 1 mL do extrato bruto em coluna de troca aniônica Sep-Pak accell plus QMA (Waters Co., Ltda, Irlanda) previamente acondicionada com 5 mL de metanol, seguidos de 5 mL de metanol:água (3:1, v:v). Posteriormente, foram aplicados 6 mL de metanol:água (3:1, v:v), seguidos de 3 mL de metanol. As fumonisinas foram eluídas com 10 mL de solução de ácido acético 0,5 % em metanol e o eluato seco a 40 °C. O resíduo foi ressuspensão em 2 mL de metanol:água (3:1, v:v), seco sob gás N₂ a 40 °C e novamente ressuspensão em 800 µL de metanol:água (3:1, v:v). Uma alíquota de 200 µL foi transferida para tubo e seca em gás N₂ a 40 °C. Os tubos com 200 µL secos foram ressuspensos em 100 µL de acetonitrila:água (1:1), derivatizados com 200 µL de o-phtaldialdeído (40 mg OPA, 1 mL de metanol, 5 mL de borato de sódio 0,1 mol L⁻¹ e 50 µL de 2- mercaptoetanol) e as injeções foram feitas dentro de 1 min em CLAE. Fumonisinas foram analisadas em sistema isocrático de fase reversa C₁₈ por CLAE (bomba LC-10 AD e detector de fluorescência RF 535, Shimadzu, Japão), usando coluna Luna 5 µ (4,6 x 250 mm; Phenomenex®, EUA). Foi utilizado comprimento de onda de 335 nm e 450 nm de excitação e emissão, respectivamente.

A fase móvel consistiu de metanol: fosfato de sódio ($\text{CH}_3\text{OH}:\text{Na}_2\text{HPO}_4$) 0,1 M (80:20, v:v) ajustado com ácido o-fosfórico a pH 3,3, fluxo de 1 mL min^{-1} . Os limites de detecção de FB_1 e FB_2 foram de 27,5 e $35,3 \text{ ng g}^{-1}$, respectivamente.

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra o nível de fumonisina produzida no substrato milho por 42 cepas de *F. verticillioides* monoesporadas de ração envolvida em intoxicação animal, no estágio de recém-isolamento em 1991. O elevado nível produzido atingiu faixas de 9,32 a $54,21 \text{ mg g}^{-1}$ de FB_1 e 3,88 a $34,92 \text{ mg g}^{-1}$ de FB_2 , com ênfase à cepa 113F, com $89,13 \text{ mg g}^{-1}$ de fumonisina total.

Inserir Tabela 1

Procedendo a análise de toxigenicidade, no ano de 2007, em 20 cepas de *F. verticillioides* originalmente isoladas em 1991 e mantidas sob sucessivos subcultivos, 90 % das cepas produziram níveis detectáveis de FB_1 ($0,28$ a $2610,6 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$) e 85 %, de FB_2 ($0,03$ a $781,1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$), porém duas cepas perderam a capacidade de produção (Tabela 2). Conseqüentemente, no decorrer de dezesseis anos de sucessivas repicagens, as cepas de *F. verticillioides* que mantiveram maior toxigenicidade ($> 1000 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$) foram a 103F (codificação 9 e 14), 119BR (codificação 18), 97K (codificação 20), com produção de fumonisina total (FB_{total}) de 1662,73; 3391,72; 1000,43 e 1685,19 $\text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente (Tabela 2). As cepas 113F e 119B (codificação 15, 16, 17 e 19) reduziram a capacidade de produção de fumonisinas, atingindo a faixa de não detectável (N.D.) a $0,34 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$.

FB_{total} analisada em 2007 apresentou decréscimo de 96,3 %, 92,4 %, 96,8 % e 95,4 % nas cepas codificadas 9, 14, 18 e 20, respectivamente, em relação a mesmas cepas em 1991 (Tabela 2).

Inserir Tabela 2

DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra alta toxigenicidade das cepas de *F. verticillioides* recém-isoladas de alimentação envolvidas em intoxicação, atingindo concentração em nível de mg de fumonisina. Salienta-se a preocupante alta toxigenicidade em isolados obtidos da principal região produtora de milho do Brasil, com nítida superioridade aos dados de Leslie *et al.* (1992), que, avaliando a produção de fumonisinas em cepas de *Fusarium*, detectaram níveis de 307,0 a 4425,0 $\mu\text{g g}^{-1}$. Almeida *et al.* (2000), estudando 66 amostras de três híbridos de milho recém-colhidos, provenientes de três regiões do Estado de São Paulo - Brasil (Assis, Capão Bonito e Ribeirão Preto), detectaram fumonisina em todos os 40 isolados de *F. verticillioides*, variando de 20 a 2168 mg g^{-1} (FB₁) e 10 a 380 mg g^{-1} (FB₂). Em condição laboratorial, a alta concentração de fumonisina pode ser atingida em grãos de milho estéreis sob alta umidade inoculados com *F. verticillioides*, sendo também dependente de cepa empregada (NELSON *et al.*, 1991).

Após o isolamento de *F. verticillioides* em 1991, a cepa 113F foi selecionada como padrão de toxigenicidade para estudos subsequentes (BUIM *et al.*, 1999). No entanto, as sucessivas repicagens-estocagem sob refrigeração em substrato não usualmente envolvido em intoxicação (meio agar batata dextrose) provavelmente afetaram a toxigenicidade de cepas. A Tabela 2 evidenciou que as cinco cepas de *F. verticillioides* isoladas em 1991 (103F, 113F, 119BR, 119B e 97K) reduziram drasticamente a produção de fumonisina em 2007, ainda que

mantidas sob mesmas condições, apresentando produção de toxina entre N.D.- 2610,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ e N.D. - 781,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ de FB_1 e FB_2 , respectivamente. Apesar da semelhança no perfil morfológico entre cepas de uma espécie, uma ampla variabilidade na produção quantitativa de metabólitos secundários pode ocorrer com um isolado específico cultivado sob mesma condição experimental (HORNOK *et al.*, 2007).

Considerando que a cepa 103F manteve maior toxigenicidade na avaliação realizada no ano de 2007 (Tabela 2), substituiu-se a cepa 113F por esta nos experimentos posteriores (ITANO *et al.*, 2008; BERND *et al.*, 2008). A diferença na produção de fumonisinas entre as cinco cepas de *F. verticillioides*, principalmente entre os 14 subcultivos de 103F (0,85 – 3391,72 $\mu\text{g g}^{-1}$ de FB_{total}) ocorreu devido a constantes repicagens seqüenciais, aliado ao tempo prolongado de armazenamento, repercutindo provavelmente na patogenicidade (Tabela 2).

O subcultivo no meio esterilizado tem sido método simples e comum na manutenção de viabilidade celular, mas com possibilidade de alteração morfológica e/ou fisiológica aliado a perda de patogenicidade original (FIGUEIREDO; PIMENTEL, 1975). Recomenda-se iniciar a cultura com conídio monoespórico, assim como evitar meio rico em carboidrato para manter a estabilidade genética (NELSON, 1992).

Autores têm registrado diferenças na estabilidade pós-preservação. Conforme Kuhls; Liekfeldt; Borner (1995), cepas idênticas de *Trichoderma* oriundas de diferentes centros de pesquisa apresentaram desvios genéticos na análise por PCR. Kelly *et al.* (1994) demonstraram deterioração devido a conservação num isolado de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* mantido por 12 anos, por *fingerprints* não estar em conformidade com *fingerprints* típicos do PCR da espécie. Ryan; Smith (2004) relataram variação morfológica de *F. oxysporum* conservados por 2 anos sob criopreservação e estocagem em água. Subcultivos repetitivos de mono e multiesporos de *Verticillium lecanii* em diferentes ágars causaram mudanças fisiológicas e morfológicas, sem afetar a virulência (HALL, 1980).

O presente estudo demonstrou diferentes níveis de fumonisinas produzidos por diferentes cepas de *F. verticillioides*, provavelmente afetada por inadequação no subcultivo, aliado ao longo período de manutenção sob esta condição. O gênero *Fusarium*, em cultivo, apresenta variabilidade morfológica e, repiques repetitivos em meios de cultura laboratorial podem desencadear mutação (ABRAMSON *et al.*, 1998). Kim (1997) observou setorização, variação morfológica e pigmentação em cultura de *F. oysporum* submetido a repicagens sucessivas. Ryan *et al.* (2002) observaram comportamento similar em outros gêneros fúngicos, i.e. a formação de setores em *Mertarhizium anisopliae*, que diferiram da cultura parental na morfologia, produção de enzimas, metabólitos secundários e redução da esporulação.

Ryan; Smith (2004) sugeriram o emprego de métodos baseados em subcultivo contínuo acoplado a estocagem em óleo, água, areia/ solo ou sílica gel em caso de ausência de alternativas. Os micologistas optam pela conservação sob liofilização, ou criopreservação na fase vapor do nitrogênio líquido (POLGE; SMITH; PARKES, 1949; HWANG 1960; TAN 1997; SMITH; RYAN, 2004).

A estabilidade de isolados fúngicos perante toxigenicidade em cultura é imprescindível para garantir os resultados experimentais, sendo que a coleção de culturas desempenha papel imprescindível para o patrimônio biológico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas concedidas aos membros pesquisadores; CNPq, CNPq-MAPA/SDA, FINEP, Fundação Araucária, UGF Fundo Paraná-SETI pelo apoio financeiro à pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Abramson D, Gan Z, Clear RM, Gilbert J, Marquardt RR. Relationships among deoxynivalenol, ergosterol and *Fusarium* exoantigens in Canadian hard and soft wheat. *International Journal of Food Microbiology*, 45: 217-224, 1998.
- Almeida AP, Correa B, Mallozzi MAB. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31: 321-326, 2000.
- Andrews S, Pitt J I. Selective medium for *Fusarium* species and dermatiaceous hyphomycetes from cereals. *Appl Environ Microbiol.*, 51: 1235-1238, 1986.
- Azevedo JL. Melhoramento genético e preservação de fungos utilizados no controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. Controle Biológico de doenças de plantas. Jaguariúna. Embrapa – CNPDA, 237-251, 1991.
- Bernd LP, Curioni AA, Basso F, Furlong EB, Ono EYS, Gerage AC, Hirooka EY. Modelagem matemática para fumonisinas em milho e perfil cromatográfico de metabólitos produzidos por *Fusarium verticillioides*. *Semina: Ciências Agrárias*, 29: 361-378, 2008.
- Bezuidenhout SC, Gelderblom WCA, Gorst-Allman CP, Horak RM, Marasas WFO, Spiteller G, Vleggaar R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 11: 743–745, 1988.
- Buim MR, Bracarense APFRL, Guimarães IG, Kawamura O, Ueno Y, Hirooka EY. Immunohistochemistry of fumonisin in poultry using avidin-biotin-peroxidase system. *Natural toxins*, 7: 279-282, 1999.
- Chatterjee D, Mukherjee SK. Contamination of Indian maize with fumonisin B₁ and its effects on chicken macrophage. *Letters in Applied Microbiology*, 18: 251-253, 1994.
- Fandohan P, Hell K, Marasas WFO, Wingfield MJ. Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in Africa. *African Journal of Biotechnology*, 12: 570-579, 2003.
- FAO- Food and Agriculture Organization (2001). An introduction to mycotoxins. Disponível em: <<http://www.fao.org>. Acesso em: 11 abr 2010.
- Figueiredo MB, Pimentel PVC. Métodos utilizados para conservação de fungos na Micoteca da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico. *Summa Phytopatologica*, 1: 299-302, 1975.
- Fisher NL, Burgess LW, Toussoun TA, Nelson PE. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology*, 72: 151-153, 1982.
- Gelderblom WCA, Rheeder JP, Legott N, Stockenstrom S. Fumonisin contamination of a corn sample associated with the induction of hepatocarcinogenesis in rats – role of dietary deficiencies. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 471- 479, 2004.

Hall RA. Effect of repeated subculturing on agar and passaging through an insect host on pathogenicity, morphology, and growth rate of *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 36: 216-222, 1980.

Hwang SW. Long term preservation of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration. *Applied Microbiology*, 14: 784-788, 1960.

Hornok L, Waalwijk C, Leslie JF. Genetic factors affecting sexual reproduction in toxigenic *Fusarium* species. *Internacional Journal of Food Microbiology*, 119: 54-58, 2007.

IARC – International Agency for Research on Cancer. Some naturally occurring substance: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. International Agency for Research on Cancer, World health Organization: França, v. 56, p.599, 1993.

Itano EN, Sasaki AA, Ribeiro AB, Fujii S, Ono EYS, Sabino M, Kawamura O, Kaminami MS, Ono MA, Hirooka EY. Effect of *Fusarium verticillioides* extract on specific antibody production against *Paracoccidioides brasiliensis*. *World Mycotoxin Journal*, 1: 375-380, 2008.

Jeffries CJ, Boyd AEW, Paterson LJ. Evaluation of selective media for the isolation of *Fusarium solani* var. *coeruleum* and *Fusarium-sulphureum* from soil and potato-tuber tissue. *Annals of Applied Biology*, 105: 471-481, 1984.

Kelly A, Alcalá-Jiménez AR, Bainbridge BW, Heale JB, Pérez- Artés E, Jiménez-Díaz RM. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* infecting chickpea. *Phytopathology*, 84: 1293-1298, 1994.

Kim DH. Induced change in DNA methylation of *Fusarium oxysporium* f. sp. *niveum* due successive transfer. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 216-221, 1997.

Kuhls K, Liekfeldt E, Borner T. PCR fingerprinting used for comparison of ex type strains of *Trichoderma* species deposited in different culture collections. *Microbiological Research*, 150: 363-371, 1995.

Leslie JF, Plattner RD, Desjardins AE, Klittich CJR. Fumonisin B₁ production by strains from different mating populations of *Giberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Mycotoxicology*, 82: 341-343, 1992.

Munkvold GP, Desjardins AE. Fumonisin in maize: Can we reduce their occurrence? *Plant disease*, 81: 556-565, 1997.

Nash SM, Snyder WC. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. *Phytopathology*, 52: 567-572, 1962.

Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, 1983.

Nelson PE, Plattner RD, Shackelford DD, Desjardins AE. Production of fumonisins by *Fusarium verticillioides* strains from various substrates and geographic areas. *Applied Environmental Microbiology*, 57:2410-2412, 1991.

- Nelson PE. Taxonomy and Biology of *Fusarium verticillioides*. *Mycopathologia*, 117: 29-36, 1992.
- Polge C, Smith AU, Parkes S. Revival of spermatozoa after dehydration at low temperatures. *Nature*, 164- 666, 1949.
- Rheeder JP, Marasas WFO, Vismser HF. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2101-2105, 2002.
- Ryan MJ, Bridge PD, Smith D, Jeffries P. Phenotypic degeneration occurs during sector formation in *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 163-168, 2002.
- Ryan MJ, Smith, D. Fungal genetic resource centres and the genomic challenge. *Mycology Research*, 108: 1351–1362, 2004.
- Santos IM, Abrunhosa L, Venancio A, Lima N. The effect of culture preservation techniques on patulin and citrinin production by *Penicillium expansum*. *Letters in Applied Microbiology* 35: 272–275, 2002.
- Shephard GS, Sydenham EW, Thiel PG, Gelderblom WCA. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography*, 13:2077–2087, 1990.
- Smith D, Ryan MJ. Current status of fungal collections and their role in biotechnology. In *Handbook of Fungal Biotechnology* (D. K. Arora, ed.): 527–538. 2nd ed. Dekker M, New York, 2004.
- Sydenham EW, Marasas WFO, Shepard GS, Thiel PG, Hirooka EY. Fumonisin concentrations in brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 994-997, 1992.
- Sweeney MJ, Dobson ADW. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Internacional Journal of Food Microbiology*, 43: 141-158, 1998.
- Tan CS. Preservation of fungi. *Cryptogamic Mycology*, 18: 157–163, 1997.
- Ueno Y, Aoyama S, Sugiura Y, Wang, DS, Lee US, Hirooka EY, Hara S, Karki T, Chen G, Yu SZ. A limited survey of fumonisin in corn and corn-based products in Asian countries. *Mycotoxin Research*, 9: 27-34, 1993.
- Voss KA, Howard PC, Riley RT, Sharma RP, Bucci TJ, Lorentzen RJ. Carcinogenicity and mechanism of action of Fumonisin B₁: a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* (= *F. verticillioides*). *Cancer Detection and Prevention*, 26: 1-9, 2002.

Tabela 1. Produção de fumonisina em cepas monoesporadas de *F. verticillioides* recém-isoladas de rações envolvidas em intoxicação animal, 1991

Intoxicação animal	Ração		<i>F. verticillioides</i>			
			Cepas	Fumonisinas (mg g ⁻¹)		
				FB ₁	FB ₂	FB _{total}
Cavalo	Espiga de milho	97	97H	33,13	14,24	47,37
			97I	35,82	13,36	49,18
			97J	34,47	9,87	44,34
			97K	25,76	11,03	36,79
			97L	31,47	13,50	44,97
Cavalo	Resíduo de milho	103	103A	32,31	10,07	42,38
			103F	33,04	11,58	44,62
			103G	31,83	9,14	40,97
			103H	28,21	9,07	37,28
			103BR	23,48	5,00	28,48
Cavalo	Resíduo de milho	104	104B	27,55	10,37	37,92
			104D	21,55	8,72	30,27
			104E	20,89	8,09	28,98
			104Ga	22,40	9,17	31,57
			104Gb	23,15	9,18	32,33
Cavalo	Resíduo de milho	113	113B	29,49	9,71	39,20
			113E	26,8	9,70	36,50
			113F	54,21	34,92	89,13
			113G	22,17	8,22	30,39
			113BR	19,53	6,46	25,99
Aves	Milho	118	118 ^a	39,11	17,49	56,60
			118C	36,11	9,60	45,71
			118D	25,72	9,35	35,07
			118F	37,93	15,86	53,79
			118BR	9,32	3,88	13,20
Aves	Ração mista	119	119B	23,53	10,20	33,73
			119C	26,63	9,19	35,82
			119E	39,67	8,27	47,94
			119Fa	37,19	11,60	48,79
			119Fb	32,08	5,13	37,21
Aves	Milho	162	119BR	24,52	6,63	31,15
			162A	34,82	11,39	46,21
			162B	34,95	13,24	48,19
			162C	32,64	10,50	43,14
			162D	35,20	11,80	47,00
Aves	Ração mista	164	162E	35,81	11,68	47,49
			162BR	23,24	4,32	27,56
			164A	34,14	11,40	45,54
			164B	26,98	10,0	36,98
			164E	27,26	9,62	36,88
Aves	Ração mista	164	164G	15,5	4,14	19,64
			164H	12,09	5,84	17,93

Tabela 2. Redução da toxigenicidade em *F. verticillioides* submetidas a repiques-estocagem a 4 °C até 2007 em relação a mesmas cepas recém-isoladas em 1991

<i>F. verticillioides</i>			Ano 2007			% redução (1991-2007)
Cepas	Ano 1991 FB _{total} (µg g ⁻¹)	Código	Fumonisinias (µg g ⁻¹)			
			FB ₁	FB ₂	FB _{total}	
103F	44620,00	1	80,76	19,83	100,59	99,8
		2	32,77	11,25	44,02	99,9
		3	495,79	106,80	602,59	98,6
		4	351,73	95,52	447,25	99,0
		5	38,37	7,90	46,27	99,9
		6	145,74	57,70	203,44	99,5
		7	463,17	155,10	618,27	98,6
		8	468,06	141,25	609,31	98,6
		9	1.259,1	403,63	1.662,73	96,3
		10	298,71	73,98	372,69	99,3
		11	435,44	115,87	551,31	98,8
		12	330,44	103,22	433,66	99,0
		13	7,35	3,47	10,85	99,9
		14	2610,65	781,07	3391,72	92,4
113F	89130,00	15	0,28	0,03	0,31	100,0
		16	0,34	N.D.	0,34	100,0
		17	N.D.	N.D.	N.D.	100,0
119BR	31150,00	18	748,08	252,35	1.000,43	96,8
119B	33730,00	19	N.D.	N.D.	N.D.	100,0
97K	36790,00	20	1.171,17	514,02	1.685,19	95,4

N.D. = não detectável, isto é, abaixo do limite de detecção do método para FB₁ e FB₂, 27,5 e 35,3 ng g⁻¹, respectivamente.

75 "Ghkgq "f g "Hvqt gu"dk veku"g"cdk veku"pc"r tqf wē q "f g" hwo qpkulpc" g"pq"et gueko gpvq "f g"

Hwuctkwo "xgt veku"qkf gu"

RESUMO

Fusarium verticillioides é uma espécie fúngica amplamente disseminada em grãos de milho e produtora de fumonisinas, as quais representam riscos à saúde humana e de animais. Em vista da exigência quanto ao controle de micotoxinas, estudos centrados nos pontos críticos de sua produção tornam-se de importância fundamental. O trabalho objetivou descrever a melhor condição para produção de fumonisinas e crescimento fúngico em função do híbrido de milho (Tork e P30F53), cepa de *F. verticillioides* com diferentes datas de repique (103F- A, repique em 2007 e 103F-B, repique em 2008), composição de meios de cultura utilizados para crescimento da cepa (A e B) e substrato submetido ou não a tratamento térmico (121 °C/20 min). Para tal, procedeu-se com um delineamento fatorial 2⁴, totalizando 16 tratamentos, os quais foram realizados em réplica. Os grãos foram avaliados antes e após o período de ensaio (20 dias), procedendo-se análises micológicas e quantificação de fumonisinas. A composição dos meios de cultura e as cepas de *F. verticillioides* não apresentaram influência significativa (p>0,05) no crescimento fúngico e na produção de fumonisinas. O tratamento térmico resultou na eliminação aparente da micobiota natural presente nos grãos de milho e sua aplicação resultou em aumentos significativos (p<0,05) na produção de fumonisinas e no crescimento fúngico, exceto para *Aspergillus* spp. e total de bolores e leveduras. Observaram-se diferenças significativas no crescimento de leveduras e na produção de fumonisinas B₁ e total em relação aos híbridos de milho, sendo os maiores níveis encontrados no Tork. Os resultados apontam as condições favoráveis para o desenvolvimento da micobiota e produção de fumonisinas em grãos de milho para prosseguimento do estudo da dinâmica da produção desta toxina.

Palavras-chave: micoflora, milho, híbrido, cepa.

ABSTRACT

Fusarium verticillioides is a fungus widespread in corn and producer of fumonisins, which cause diseases in human and animals. Concerning mycotoxins control, studies on critical points of its production become crucial. This study aims to describe the best condition for fumonisins production and fungal count concerning corn hybrid (Tork and P30F53), *F. verticillioides* strain with different culture dates (103F- A, subcultured in 2007 and 103F-B, subcultured in 2008), marks of culture medium used for strain growth (A and B) and substrate corn subjected or not to heat treatment (121 °C/ 20 min). A 2⁴ factorial design was conducted, totaling 16 treatments, which were made in reply. The grains were evaluated before and after the incubation time (20 days), proceeding mycological analysis and fumonisins quantification. The marks of culture medium and *F. verticillioides* strains did not influence significantly (p> 0.05) fungal count and fumonisins production. The heat treatment resulted in the apparent elimination of the natural mycoflora present in corn grains, and its application provided significant increases (p <0.05) on fumonisins production and fungal count, except for *Aspergillus* sp. and total molds/ yeasts. There were significant differences in yeasts count and fumonisins B₁ and total production to corn hybrids, being the highest levels in Tork hybrid. The results indicate favorable conditions for the mycoflora growth and fumonisin production on corn grain for further studies of dynamic of fumonisin production.

Key words: mycoflora, corn, hybrid, strain.

1. Introdução

O milho é um dos cereais mais cultivados em todos os continentes e é estratégico na agropecuária brasileira, sendo que cerca de 82 % de todo o milho produzido internamente é consumido sob a forma de ração, enquanto seu processamento em alimentos destinados ao consumo humano está estável desde o início da década de 80, em 13 % da produção total (ABIMILHO, 2010). Segundo a CONAB (2010), a safra nacional de milho 2009/2010 deve alcançar a produção de 51,3 milhões de toneladas, sendo a produção nacional total de grãos estimada em 143,95 milhões de toneladas.

Alguns fatores inerentes à produção afetam a qualidade do milho, a exemplo da própria cultivar, solo, fertilização, condições climáticas desfavoráveis, danos mecânicos, secagem inadequada, armazenamento impróprio, pragas e contaminação por microrganismos e micotoxinas (LÁZZARI, 1997).

Tratando-se de cultivar, a necessidade de aumento da produtividade submeteu o milho a um intenso processo de melhoramento genético, resultando em diversos híbridos comerciais desenvolvidos especialmente para locais específicos e regionais. Aliado ao bom desempenho agrônomo dos híbridos, outro fator importante para obtenção de altas produtividades é a resistência destes materiais à incidência de determinados patógenos (ABIMILHO, 2010; SANTOS *et al.*, 2002a).

Dentre os microrganismos contaminantes de milho, destacam-se os fungos micotoxigênicos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, os quais são responsáveis pela grande maioria das micotoxinas conhecidas. Enquanto as espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* são mais comumente encontradas como contaminantes de produtos durante a secagem e armazenamento, as espécies de *Fusarium* são patógenos da planta, que produzem micotoxinas antes ou imediatamente após a colheita (SWEENEY; DOBSON, 1998). *Fusarium verticillioides* destaca-se pela maior incidência em milho e pela produção de metabólito secundário tóxico pertencente ao grupo das fumonisinas, as quais causam micotoxicoses em animais. Estudos epidemiológicos também tem demonstrado associação positiva entre a exposição à dieta com fumonisina e aumento do risco de câncer em seres humanos (FRANCESCHI *et al.*, 1990; CHU; LI, 1994; RHEEDER *et al.*, 1992; SYDENHAM *et al.*, 1990).

O crescimento fúngico e a produção de micotoxinas são resultados da interação de muitos fatores e, portanto, um entendimento de cada fator envolvido é essencial para compreender o processo global e prevenir a produção de micotoxinas (CHARMLEY;

ROSENBER; TRENHOLM, 1994). As condições ambientais têm um impacto importante sobre o crescimento de fungos e desempenham um papel fundamental na epidemiologia de micotoxicoses. Além disso, a produção de micotoxinas é geneticamente regulada em resposta às condições ambientais (HOLLINGER; EKPERIGIN, 1999). Temperatura e disponibilidade de água são os principais fatores ambientais que influenciam o crescimento e interação entre *Fusarium* spp. e outros fungos (MARÍN *et al.*, 1998a). Regiões tropicais e subtropicais são as mais favoráveis para o desenvolvimento fúngico em cereais e produção destas toxinas (CAHAGNIER; MELCION; RICHARD-MOLARD, 1995).

Em amostras *in natura*, as concentrações de fumonisinas têm sido normalmente abaixo de $10 \mu\text{g g}^{-1}$ (MORENO *et al.*, 2009; VANARA; REYNERI; BLANDINO, 2009; CASTELLS *et al.*, 2008). Porém, sob condições laboratoriais, altas concentrações de fumonisinas podem ser obtidas inoculando *F. verticillioides* em milho estéril com altos conteúdos de umidade. A quantidade de fumonisina também é dependente da cepa fúngica empregada no cultivo (NELSON *et al.*, 1991; TSENG *et al.*, 1995; VISCONTI; DOKO, 1994). No entanto, fungos toxigênicos filamentosos cultivados em cultura apresentam uma elevada tendência para a mudança espontânea, seja morfológica (setorização, por exemplo) ou fisiológica (produção de metabólitos secundários, por exemplo). As variações talvez sejam relacionadas às condições de cultura e também ao número de gerações (SANTOS *et al.* 2002b).

Neste trabalho foi avaliada a influência de fatores bióticos (híbrido de milho e cepa de *F. verticillioides* com diferentes datas de repique) e abióticos (composição de meio de cultura utilizado no crescimento da cepa e aplicação de tratamento térmico aos grãos de milho) no crescimento de *F. verticillioides* e produção de fumonisinas para prosseguir, em trabalhos futuros, com o estudo da dinâmica da produção desta toxina.

2. Material e Métodos

2.1. Híbridos de milho

A matéria-prima utilizada no trabalho foi milho do híbrido simples Tork (Syngenta[®]), e do híbrido simples P30F53 (Pioneer[®]), ambos cultivados na safra 2007 e disponibilizados pelo Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR-PR).

2.2. Cepa fúngica

Cepa fúngica de *F. verticillioides* 103F utilizada 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 Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Estadual de Londrina – UEL. Foram utilizadas duas culturas desta cepa com datas de repique diferentes, sendo uma de 2007 (cepa 103F – A) e outra de 2008 (cepa 103F – B), das quais foram preparadas suspensões de propágulos em água destilada contendo 0,1 % de Tween 80, ambos estéreis, obtendo-se a concentração de $2,33 \times 10^7$ propágulos mL⁻¹.

2.3. Meios de cultura

Foram utilizadas duas marcas comerciais (A e B), com composições diferentes, do meio de cultura ágar batata dextrose, no qual se procedeu ao crescimento da cepa de *F. verticillioides* pré-inoculação no milho. A composição (g L⁻¹) do meio da marca “A” foi: Infusão de batatas = 200 g, Dextrose = 20 g, Agar = 15 g; e o da marca “B” foi: Infusão de batatas = 300 g, Dextrose = 20 g, Agar = 15 g.

2.4. Procedimento operacional

Uma porção de 500 g de grãos milho, submetida ou não a tratamento térmico a 121 °C/ 20 minutos em calor úmido, teve a umidade ajustada para 25 % adicionando-se água destilada estéril. Uma alíquota de 1 mL da suspensão de propágulos foi inoculada nos grãos, sendo que a fim de evitar-se o aumento da atividade de água do meio no momento da inoculação e para proporcionar melhor distribuição dos propágulos fúngicos, adicionou-se 0,75 g de solo estéril de granulometria 20 µm (PALÁCIOS-CABRERA *et al.*, 2001; BERND *et al.*, 2008). Posteriormente, os grãos de milho foram incubados a 20 °C por 20 dias, sendo esta a temperatura ótima para produção de fumonisina relatada por Bernd *et al.* (2008) após validação de modelagem matemática.

Procedeu-se com um delineamento fatorial 2^4 , totalizando 16 tratamentos, os quais foram realizados em réplica. No planejamento, as variáveis independentes consistiram de dois híbridos de milho (Tork e P30F53), as duas composições de Agar Batata Dextrose (A e B), nas quais o cultivo foi ativado; as duas cepas de *F. verticillioides* com diferentes períodos de repique (103F-A, repique em 2007 e 103F-B, repique em 2008) e contaminação dos grãos de milho (grãos submetidos a tratamento térmico a 121 °C/20 minutos e grãos não submetidos a este tratamento, ou seja, com sua microbiota natural). Os frascos contendo os grãos foram

homogeneizados manualmente a cada 7 dias para melhor dispersão fúngica. Os grãos foram avaliados antes (tempo zero – t_0) e após o período de ensaio (20 dias - t_{20}), procedendo-se análises microbiológicas e quantificação de fumonisinas. Os níveis e fatores do planejamento fatorial aplicado estão expressos na Tabela 1. Para fins de análise estatística, utilizou-se o programa “Statistica, versão 6.0” e, procedeu-se com a conversão em escala logarítmica para os resultados referentes à contagem fúngica.

2.5. Análises Microbiológicas –Contagem de bolores e leveduras

Decorridos os 20 dias de incubação, as amostras de milho foram trituradas e preparadas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) em água peptonada 0,1 %. Uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição foi plaqueada em ágar batata dextrose (BDA), acidificado a pH 4,0 com ácido tartárico. As placas foram incubadas a 25 °C por 5 dias. Após contagem total de colônias fúngicas, os gêneros foram identificados de acordo Nelson; Toussoun; Marasas (1983) e Samson; Hoeskstra; Frisvad (1995).

2.6. Determinação de Fumonisina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A determinação de fumonisinas foi realizada por CLAE de acordo com a metodologia descrita por Shephard *et al.* (1990), modificada por Ueno *et al.* (1993). Para extração, um volume de 30 mL de metanol: água (3:1, v:v) foi adicionado a 10 g de amostra triturada (50 mesh), seguido de agitação a 150 r.p.m. por 1 hora a 10 °C (incubadora refrigerada Marconi®). Após filtração, foi aplicado 1 mL do extrato bruto em coluna de troca aniônica Sep-Pak accell plus QMA (Waters Co., Ltda, Irlanda) previamente acondicionada com 5 mL de metanol, seguido de 5 mL de metanol:água (3:1, v:v). Posteriormente, foram aplicados 6 mL de metanol:água (3:1, v:v), seguidos de 3 mL de metanol. As fumonisinas foram eluídas com 10 mL de solução ácido acético 0,5 % em metanol e o eluato seco a 40 °C. O resíduo foi ressuspenso em 2 mL de metanol:água (3:1, v:v), seco sob gás N₂ a 40 °C e novamente ressuspenso em 800 µL de metanol:água (3:1, v:v). Alíquotas de 200 µL foram secas em gás N₂ a 40 °C. Uma alíquota de 200 µL foi ressuspensa em 100 µL de acetonitrila:água (1:1), derivatizada com 200 µL de o-phtaldialdeído (40 mg de OPA, 1 mL de metanol, 5 mL de borato de sódio a 0,1 mol L⁻¹ e 50 µL de 2- mercaptoetanol) e as injeções foram feitas dentro de 1 min em CLAE. Fumonisininas foram analisadas em sistema isocrático de fase reversa por CLAE (bomba LC-10 AD e detector de fluorescência RF 535, Shimadzu, Japão), usando coluna C₁₈ Luna 5 µ (4,6 x 250 mm; Phenomenex®, EUA). Foi utilizado comprimento de

onda de 335 nm e 450 nm de excitação e emissão, respectivamente. A fase móvel consistiu de metanol: fosfato de sódio ($\text{CH}_3\text{OH}:\text{Na}_2\text{HPO}_4$) 0,1 M (80:20, v:v) ajustado com ácido o-fosfórico a pH 3,3, fluxo de 1 mL min^{-1} . O limite de detecção de FB_1 e FB_2 foi 27,5 e 35,3 ng g^{-1} , respectivamente.

3. Resultados e Discussão

A Tabela 2 apresenta o perfil inicial (tempo zero- t_0) da micobiota fúngica e contaminação natural por fumonisinas dos híbridos de milho, Tork e P30F53, destinados ao presente estudo, comparando os grãos submetidos ou não ao tratamento térmico ($121 \text{ }^\circ\text{C}/20 \text{ min}$).

Os dois híbridos de milho estudados no presente trabalho mostraram-se similares entre si em relação à contaminação fúngica. Contaminação inicial por *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. também foi encontrada por Moreno *et al.* (2009) em milho proveniente das safras de 2003 e 2004 da região Norte do Paraná; e por Richard *et al.* (2007), os quais investigaram a micoflora de milho seco armazenado em silo na França. Estes também foram os gêneros mais freqüentes encontrados em amostras de milho provenientes de Buenos Aires, Argentina, no período de 2005-2006, nas faixas de 10^4 a 10^6 UFC g^{-1} (ROIGÉ *et al.*, 2009). Almeida *et al.* (2000) identificaram a contaminação fúngica de três híbridos de milho recém-colhidos em três regiões do Estado de São Paulo, onde a população era composta principalmente dos gêneros *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp.

A contagem de *Fusarium* spp. ($1,5 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^5 \text{ UFC g}^{-1}$, híbrido Tork; $3,6 \times 10^4 \pm 5,6 \times 10^3 \text{ UFC g}^{-1}$, híbrido P30F53) e de *Penicillium* spp. ($8,5 \times 10^5 \pm 7,0 \times 10^4 \text{ UFC g}^{-1}$, híbrido Tork; $6,7 \times 10^5 \pm 6,0 \times 10^5 \text{ UFC g}^{-1}$, híbrido P30F53) foram semelhantes aos dados relatados por Moreno *et al.* (2009), sendo estes de 10^2 a 10^5 UFC g^{-1} nas etapas de recepção e pré-secagem (safra 2003) de três indústrias processadoras de milho. A contagem de *Aspergillus* spp. do híbrido Tork ($2,2 \times 10^5 \pm 3,1 \times 10^4 \text{ UFC g}^{-1}$) também foi similar (10^2 a 10^5 UFC g^{-1}) às amostras coletadas por estes mesmos autores na etapa de pré-secagem.

Na safra de 2003, Moreno *et al.* (2009) detectaram fumonisinas em 100 % das amostras, variando de 0,08 a $15,32 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ na etapa de recepção ($n = 90$) e de 0,11 a $18,78 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ nas amostras coletadas na etapa de pré-secagem ($n = 60$). Similarmente ao lote de milho utilizado no ensaio (Tabela 1), o qual teve contaminação de FB_1 e FB_2 de $3,99 \pm 0,08 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ e $2,12 \pm 0,14 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, no híbrido Tork; e de FB_1 e FB_2 de $2,97 \pm 0,08 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ e

1,45±0,20 µg g⁻¹, respectivamente, no híbrido P30F53, mostrando a dificuldade em se obter milho isento de fumonisina na região.

O tratamento térmico de 121 °C/ 20 min não afetou significativamente a concentração de FB₂ (p>0,05) tanto no híbrido Tork, quanto no P30F53. No entanto, para o Tork, a concentração de FB₁ teve decréscimo significativo (p<0,05) após a aplicação do tratamento térmico aos grãos de milho, de 3,99±0,08 µg g⁻¹ para 2,01±0,04 µg g⁻¹. No híbrido P30F53, o mesmo fato não foi observado, uma vez que não houve alteração significativa após tratamento térmico (p>0,05), indicando a estabilidade térmica desta toxina, com possibilidade de permanência inalterada em processos normalmente empregados para obtenção de produtos derivados. Alberts *et al.* (1990) não observaram redução na concentração de FB₁ após tratamento térmico a 60 °C por 24 horas no material de cultivo de *F. verticillioides*, cepa MRC 826. No entanto, quando altas temperaturas são usadas, alguma redução pode ser observada. Jackson *et al.* (1997) relataram redução de 16 % dos níveis de FB₁ em cozimento de produto à base de milho a 175 °C por 20 min.

Conforme a Tabela 2, o tratamento térmico (121 °C/ 20 min) resultou na redução aparente da microbiota natural presente nos grãos de milho, uma vez que o perfil microbiológico de substrato milho tratado termicamente teve redução significativa (p<0,05) para os gêneros *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp., sendo, em algumas vezes, não detectável. O fato não foi observado com a contagem de *Penicillium* spp., uma vez que o tratamento térmico não reduziu significativamente a contaminação deste gênero no milho do híbrido Tork; e, apesar de redução significativa no P30F53, células viáveis foram identificadas pós-tratamento térmico em nível de 3,8x10²±4,0x10² UFC g⁻¹. Isto pode ser justificado pela distribuição/penetração não uniforme de calor na massa de substrato, isto é, em toda a porção de 500 g dos grãos submetida ao tratamento térmico.

A Tabela 3 mostra os níveis de significância (valores de “p”) para as repostas avaliadas estatisticamente em função das variáveis independentes utilizadas no planejamento experimental 2⁴ (híbrido de milho, marca de meio de cultura para crescimento da cepa, data de repique da cepa e tratamento térmico nos grãos pré-inoculação fúngica). É possível observar que a composição do meio de cultura (A e B) e as cepas de *F. verticillioides* com datas de repique distintas (103F-A e 103F-B) foram as únicas variáveis que não apresentaram influência significativa (p>0,05) em nenhuma das repostas estudadas. O fato evidencia que a composição do meio de cultura utilizado para repique das cepas não influenciou no crescimento fúngico e na produção de fumonisinas e que as duas cepas testadas apresentam potenciais similares de produção de fumonisinas, o que demonstra a manutenção da

toxigenicidade entre si. Segundo Fargues; Roberts (1983), a estabilidade genética de diferentes fungos vem sendo analisada e observa-se que, para algumas espécies, ocorre um declínio na patogenicidade após subcultivo seriado.

Conforme demonstra a Tabela 3, somente o tratamento térmico 121 °C/20 min influenciou significativamente ($p < 0,05$) na produção de FB_2 e contagem de *Fusarium* spp. e de *Penicillium* spp. Por outro lado, ambos os híbridos (Tork e P30F53) e tratamento térmico tiveram efeito significativo ($p < 0,05$) na contagem de leveduras e produção de fumonisinas (FB_1 e FB_{total}). Para a contagem de *Aspergillus* spp. e total de bolores e leveduras nenhuma variável teve efeito significativo ($p > 0,05$).

Mediante análise da Figura 1a, observa-se que quando se utilizou o híbrido Tork, a cepa de *F. verticillioides* apresentou maior produção de fumonisinas B_1 , B_2 e B_{total} , apesar de somente a primeira (FB_1) ter tido efeito significativo com relação ao híbrido. Para o crescimento fúngico (Figura 1b), apesar do híbrido de milho ter influenciado significativamente somente na contagem de leveduras, onde a utilização de P30F53 ocasionou uma inibição das mesmas, observou-se uma tendência a comportamento semelhante frente ao crescimento de *Aspergillus* e *Penicillium* spp. neste híbrido. Porém, efeito inverso ocorreu no crescimento de *Fusarium* spp., uma vez que houve maior contagem deste gênero no híbrido P30F53, em comparação ao Tork (Figura 1b).

Segundo pesquisa realizada pela EMBRAPA (2010), onde se efetuou a caracterização dos principais híbridos de milho cultivados no Brasil, os dois (Tork e P30F53) utilizados no presente trabalho, apresentaram diferenças em relação a algumas características agrônômicas. Em se tratando de textura do grão, por exemplo, o híbrido P30F53 teve característica de grão semi-duro, enquanto o híbrido Tork, de grão duro. Em relação ao seu comportamento frente às principais doenças de campo, as empresas produtoras dos respectivos híbridos fornecem dados de que ambos apresentam susceptibilidade moderada (Syngenta[®], 2010; Pioneer[®], 2010). Segundo EMBRAPA (2010), especificando a doença de grãos em fusariose, o P30F53 tem característica de susceptibilidade à esta doença, já o híbrido Tork é medianamente susceptível. Estas características explicam o fato do crescimento de *Fusarium* spp. ter sido facilitado no híbrido P30F53 (Figura 1b).

Avaliando-se o comportamento das respostas frente ao tratamento térmico (121 °C/20 min) aplicado no substrato milho pré-inoculação (Figura 2), observou-se maior capacidade da cepa de *F. verticillioides* em produzir fumonisinas quando o substrato milho teve sua microbiota reduzida, i.e., com aplicação de tratamento térmico (Figura 2a), apesar de só a produção de FB_1 ter tido aumento significativo em comparação a não aplicação do tratamento.

Resultados similares foram encontrados por Velutti *et al.* (2000), os quais constataram uma redução na produção de fumonisinas por *F. verticillioides* e *F. proliferatum* quando havia competição com *F. graminearum* em temperaturas de 15 °C e 25 °C e atividade de água 0,98, 0,95 e 0,93. Comportamento semelhante foi observado quando cevada foi irradiada na dose de 2 kGy com posterior inoculação de *Aspergillus alutaceus* var. *alutaceus*, o que resultou em redução da micoflora competitiva e, conseqüente, elevação da produção de ocratoxina A (CHELAK *et al.*, 1991). A inoculação pós-irradiação de grãos de milho com *P. purpurogenum* resultou em aumento da produção de rubratoxina-B comparado com controle não irradiado (ABD EL-AAL; AZIZ, 1996). Há outros relatos na literatura (CURERO; SMITH; LACEY, 1987; MISLIVEC; TRUCKSESS; STOLOFF, 1988; KARUNARATNE; WEZENBERG; BULLERMAN, 1990) de fungos ou bactérias que afetam o crescimento e /ou toxicidade de fungos produtores de toxinas. Em alguns casos, houve aumento da produção de toxinas, enquanto em outros, os microrganismos concorrentes causaram diminuição dos níveis de micotoxinas.

A redução da micoflora competitiva também possibilitou maior contagem de *Fusarium* spp. (Figura 2b), provavelmente representado pela cepa de *F. verticillioides* 103F que foi inoculada no substrato. Aliado a isto, a aplicação de tratamento térmico resultou em uma menor contagem dos demais gêneros inicialmente presentes nos grãos de milho (t_0 ; *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e leveduras; Figura 2b) ao final dos 20 dias de incubação. Esses resultados possibilitam, em trabalhos futuros, a elucidação dos fatores e condições reais de produção de fumonisina sem interferência de competidores e/ou metabólitos, favorecendo, conseqüentemente, o melhor entendimento da dinâmica da produção de fumonsina.

O efeito negativo que a competição fúngica presente nos grãos de milho exerce no crescimento de *F. verticillioides* também é relatado por outros autores. Velutti *et al.* (2000), avaliando o efeito da competição fúngica na colonização de grãos de milho, observaram que a população de *F. verticillioides* e de *F. proliferatum* foram reduzidas pela presença de *F. graminearum*, sob todas as condições avaliadas. No entanto, a presença de *F. verticillioides* ou *F. proliferatum* exerceu uma inibição limitada na população de *F. graminearum*. O fato pode ser explicado pelas diferentes taxas de crescimento e capacidade de esporulação dos diferentes gêneros e espécies, sendo ambas as características importantes para a ocupação no nicho ecológico, evidenciando a capacidade de competição entre os gêneros/espécies (MAGAN; LACEY, 1984; RAMAKRISHNA; LACEY; SMITH, 1993). Nas interações interespecíficas entre fungos, fatores ecológicos irão exercer pressão seletiva na micobiota, influenciando o domínio das espécies (MAGAN; LACEY, 1984).

BLANEY; RAMSEY; TYLER, (1986) também encontraram uma correlação negativa entre *F. graminearum* e *F. verticillioides*, e atribuíram isto à competição por substrato, produção de substâncias antagônicas e condições ambientais que influenciaram diferentemente a contaminação de milho por estas duas espécies.

Em relação à competição entre fungos de diferentes gêneros, estudos elucidam que comportamentos distintos ocorrem em razão de condições ambientais específicas. Marín *et al.* (1998b) observaram que ambos *Aspergillus* spp. e *P. implicatum* foram inibidos por espécies de *Fusarium* sob atividade de água de grãos de milho de 0,98. Em contraste, a 0,93-0,95 de atividade de água, eles foram dominantes contra *Fusarium* spp. Os mesmos autores estudaram a taxa de crescimento de algumas espécies fúngicas e observaram que, em geral, *P. implicatum* teve um crescimento mais rápido, seguido de *A. niger* e *A. ochraceus*; enquanto que espécies de *Fusarium* e *A. flavus* tiveram crescimentos mais lentos.

4. Conclusões

A aplicação de tratamento térmico em grãos de milho influenciou na produção de fumonsinas por cepa de *F. verticillioides* pré-inoculada nos mesmo, além de proporcionar maior crescimento da espécie fúngica. O híbrido de milho teve influência na produção de fumonisina FB₁, sendo que no Tork observou-se maior produção. Estes dados indicam os fatores bióticos e abióticos que afetam o crescimento fúngico e produção de fumonisinas e auxiliam em pesquisas futuras que visam o melhor entendimento da dinâmica da produção da toxina; o que contribui para a prevenção da contaminação em grãos.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas concedidas aos membros pesquisadores; CNPq, CNPq-MAPA/SDA, FINEP, Fundação Araucária, UGF Fundo Paraná-SETI pelo apoio financeiro à pesquisa.

6. Referências

ABD EL-AAL, S. S.; AZIZ, N. H. Influence of competitive microbial flora and inoculum size of *Penicillium pwpurogenum* on the production of rubratoxin-B in corn medium before and after exposure to gamma radiation. **Food Research International**, v.28, p. 521-524, 1996.

ABIMILHO- Associação Brasileira das Indústrias Moageiras de Milho. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br>>. Acesso em: 13 março 2010.

ALBERTS, J. F.; GELDERBLUM, 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 B₁ by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1729-1733, 1990.

ALMEIDA, A. P.; CORRÊA, B.; MALLOZZI, M. A. B.; SAWAZAKI, E.; SOARES, L. M. V. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 321-326, 2000.

BERND, L. P.; CURIONI, A. A.; BASSO, F.; FURLONG, E. B.; ONO, E. Y. S.; GERAGE, A. C.; HIROOKA, E. Y. Modelagem matemática para fumonisinas em milho e perfil cromatográfico de metabólitos produzidos por *Fusarium verticillioides*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, p. 361-378, 2008.

BLANEY, B. J.; RAMSEY, M. D.; TYLER, A. L. Mycotoxins and toxigenic fungi in insect-damaged maize harvest during 1983 in far North Queensland. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 37, p. 235-244, 1986.

CAHAGNIER, B.; MELCION, D.; RICHARD-MOLARD, D. Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B₁ on maize grain as a function of different water activities. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 247-251, 1995.

CASTELLS, M.; MARÍN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Distribution of fumonisins and aflatoxins in corn fractions during industrial cornflake processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p.81-87, 2008.

CHARMLEY, L. L.; ROSENBERG, A.; TRENHOLM, H. L. Factors responsible for economic losses due to *Fusarium* mycotoxin contamination of grains, foods and feedstuffs. In: MILLER, J. D.; TRENHOLM, H. L. (Eds.), **Mycotoxins in Grain Compounds Other Than Aflatoxin**, Eagan Press, St. Paul, Minnesota, USA, p. 471-486, 1994.

CHELAK, W. S.; BORSA, J.; MARQUARDT, R. R.; FROHLICH, A. A. Role of the 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.

CHU, F. S.; LI, G. Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the Peoples Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p 847-852, 1994.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Safras de grãos**: Brasil/produtores. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em 11 março 2010.

CUERO, R. G.; SMITH, J. E.; LACEY, J. Stimulation by *Hyphopichia burtnii* and *Bacillus amyloliquefaciens* of aflatoxins production by *Aspergillus flavus* in irradiated maize and rice grains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 1142-1146, 1987.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>> Acesso em: 2 março 2010.

- FARGUES, J. F.; ROBERT, P. H. Effects of passage through scarabeid hosts on virulence and specificity of two strains of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 576-583, 1983.
- 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, 1407-1411, 1990.
- HOLLINGER, K.; EKPERIGIN, H. E. Mycotoxicosis in food producing animals. **Veterinary Clinics of North America**, v. 15, p. 133-165, 1999.
- JACKSON, L. S.; KATTA, S. K.; FINGERHUT, D. D.; DE VRIES, J. W.; BULLERMAN, L. B. Effects of baking and frying on the fumonisin B₁ content of cornbased foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4800-4805, 1997.
- KARUNARATNE, A.; WEZENBERG, E.; BULLERMAN, L. B. Inhibition of mold growth and aflatoxin production by *Lactobacillus* spp. **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 230-236, 1990.
- LÁZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2 ed. Curitiba. Edição do autor, 148 p., 1997.
- MAGAN, N.; LACEY, J. Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 82, p. 83-93, 1984.
- MARÍN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; VINAS, I.; MAGAN, N. Environmental factors, in vitro interspecific interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species isolated from maize grain. **Mycological Research**, v. 102, p. 831-837, 1998a.
- MARÍN, S.; SANCHIS, V.; ARNAU, F.; RAMOS, A. J.; MAGAN, N. Colonisation and competitiveness of *Aspergillus* and *Penicillium* species on maize grain in the presence of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, p. 107-117, 1998b.
- MISLIVEC, P. B.; TRUCKSESS, M. W.; STOLOFF, L. Effect of other toxigenic molds species on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in sterile broth shake culture. **Journal of Food Protection**, v. 51, p. 449-451, 1988.
- MORENO, E. C.; GARCIA, G. T.; ONO, M. A.; VIZONI, E.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. **Food Chemistry**, v. 116, p. 220-226, 2009.
- 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, 1983.
- NELSON, P. E.; PLATTNER, R. D.; SHACKELFORD, D. D.; DEJARDINS, A. E. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2410-2412, 1991.
- 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**. 19th ASIC Coffee Conference, Trieste, Italy, 14-18 May, 2001.

PIONEER[®]. Disponível em: <<http://www.pioneersementes.com.br/>>. Acesso em: 12 março 2010.

RAMAKRISHNA, N.; LACEY, J.; SMITH, E. Effects of water activity and temperature on the growth of fungi interacting on barley grain. **Mycology Research**, v. 97, p. 1393-1402, 1993.

RICHARD, E.; HEUTTE, N.; SAGE, L.; POTTIER, D.; BOUCHARTE, P.; LEBAILLY, P.; GARON, D. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2420-2425, 2007.

RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. S.; VAN SCHALKWYK, D. J. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, v. 82, p. 253-257, 1992. (1992).

ROIGÉ, M. B.; ARANGUREN, S. M.; RICCIO, M. B.; PEREYRA, S.; SORACI, A. L.; TAPIA, M. O. Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, p. 233-237, 2009.

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

SANTOS, P. G.; JULIATTI, F. C.; BUIATTI, A. L.; HAMAWAKI, O. T. Avaliação do desempenho agrônômico de híbridos de milho em Uberlândia, MG. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 597-602, 2002a.

SANTOS, I. M.; ABRUNHOSA, L.; VENANCIO, A.; LIMA, N. The effect of culture preservation techniques on patulin and citrinin production by *Penicillium expansum* Link. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 272-275, 2002b.

SHEPHARD G. S.; SYDENHAM E. W.; THIEL P. G.; GELDERBLOM W. C. A. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, p. 2077-2087, 1990.

SYDENHAM, E. W.; THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O.; SHEPHARD, G. S.; SCHALKWYK, D. J.; KOCK, K. R. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 767-771, 1990.

SYNGENTA[®]. Disponível em: <<http://www.syngenta.com.br/pt/Pages/home.aspx>>. Acesso em: 12 março 2010.

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

TSENG, T.; LEE, K.; DENG, T.; LIU, C.; HUANG, J. Production of fumonisin by *Fusarium* species of Taiwan. **Mycopathologia**, v. 130, p. 117-121, 1995.

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

VANARA, F.; REYNERI, A.; BLANDINO, M. Fate of fumonisin B₁ in the processing of whole maize during dry-milling. **Food Control**, v. 20, p.235-238, 2009.

VELLUTI, A.; MARÍN, S.; BETTUCCI, 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. 59, p. 59-66, 2000.

VISCONTI, A.; DOKO, M. B. Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v. 77, p. 546-550, 1994.

Tabela 1 - Níveis e fatores do planejamento experimental 2⁴

Fatores	Mínimo (-1)	Máximo (+1)
Híbrido de milho	Tork	P30F53
Meio de cultura	A	B
Cepas de <i>F. verticillioides</i>	103F – A	103F – B
Tratamento térmico (121 °C/20 min)	Com	Sem

Tabela 2 - Perfil microbiológico e contaminação por fumonisina no milho utilizado no ensaio (t₀), híbridos Tork e P30F53, safra 2007

Parâmetros	Híbrido Tork		Híbrido P30F53		Valores de “p”
	Sem TT	Com TT	Sem TT	Com TT	
<i>Fusarium</i> spp. (UFC g ⁻¹)	1,5x10 ⁵ ±1,4x10 ⁵ ^{b,e}	ND ^a	3,6x10 ⁴ ±5,6x10 ³ ^{d,e}	1,2x10 ² ±3,5x10 ¹ ^c	0,000
<i>Penicillium</i> spp. (UFC g ⁻¹)	8,5x10 ⁵ ±7,0x10 ⁴ ^a	3,7x10 ⁶ ±1,9x10 ⁶ ^a	6,7x10 ⁵ ±6,0x10 ⁵ ^a	3,8x10 ² ±4,0x10 ² ^b	0,001
<i>Aspergillus</i> spp. (UFC g ⁻¹)	2,2x10 ⁵ ±3,1x10 ⁴ ^b	ND ^a	ND ^a	ND ^a	0,000
Leveduras (UFC g ⁻¹)	7,0x10 ⁵ ±9,8x10 ⁵ ^a	5,0x10 ¹ ±7,0x10 ¹ ^a	3,9x10 ⁵ ±5,5x10 ⁵ ^a	ND ^a	0,716
Total bolores e leveduras (UFC g ⁻¹)	1,8x10 ⁶ ±9,1x10 ⁵ ^a	3,7x10 ⁶ ±1,9x10 ⁶ ^a	1,0x10 ⁶ ±1,0x10 ⁶ ^a	4,3x10 ² ±4,7x10 ² ^b	0,002
Fumonisina FB ₁ (µg g ⁻¹)	3,99±0,08 ^{b,e}	2,01±0,04 ^a	2,97±0,08 ^{d,f}	3,25±0,33 ^{c,e,f}	0,001
Fumonisina FB ₂ (µg g ⁻¹)	2,12±0,14 ^a	1,80±0,36 ^a	1,45±0,20 ^a	1,99±0,22 ^a	0,177

* ND = não detectável.

** TT = tratamento térmico a 121 °C/ 20 minutos.

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

Tabela 3 - Níveis de significância (valores de “p”) referentes às variáveis estudadas no planejamento experimental 2⁴: híbrido de milho (Tork e P30F53), composição do meio de cultura (A e B) para crescimento da cepa, cepas de *F. verticillioides* com diferentes datas de repicagem (103F - A e 103F - B) e tratamento térmico a 121 °C/20 min (com e sem)

Parâmetros	Híbrido	Meio de cultura	Cepas de <i>F. verticillioides</i>	Tratamento térmico
<i>Fusarium</i> spp. (UFC g ⁻¹)	0,059	0,585	0,545	0,012
<i>Penicillium</i> spp. (UFC g ⁻¹)	0,057	0,832	0,053	0,000
<i>Aspergillus</i> spp. (UFC g ⁻¹)	0,148	0,587	0,720	0,172
Leveduras (UFC g ⁻¹)	0,003	0,951	0,941	0,000
Total Bolores e leveduras (UFC g ⁻¹)	0,129	0,254	0,931	0,381
Fumonisina FB ₁ (µg g ⁻¹)	0,045	0,911	0,421	0,010
Fumonisina FB ₂ (µg g ⁻¹)	0,055	0,704	0,496	0,009
Fumonisina FB _{total} (µg g ⁻¹)	0,046	0,813	0,445	0,008

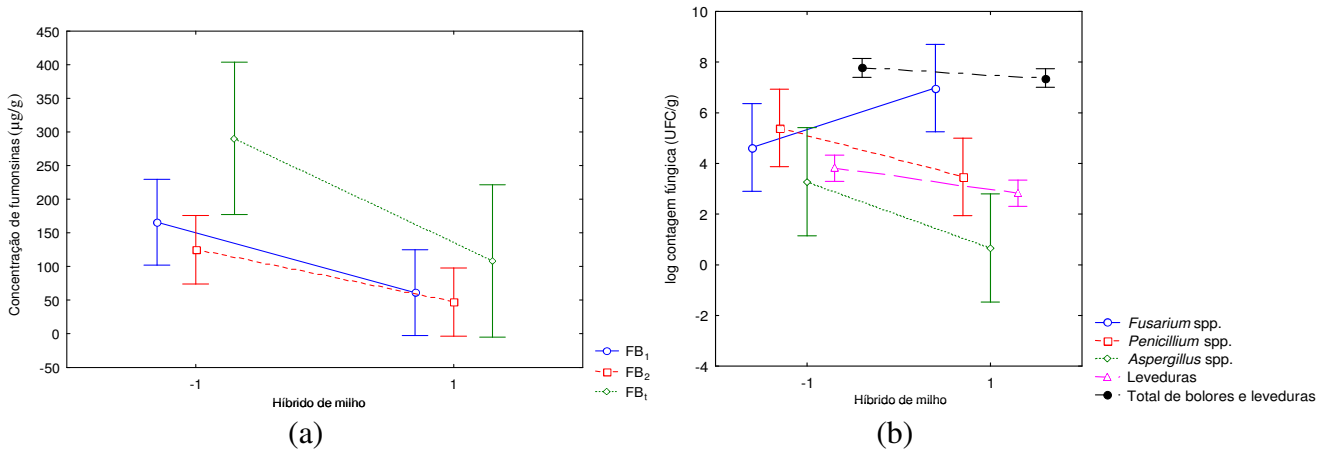


Figura 1. Produção de fumonisinas (a) e crescimento fúngico (b) em função dos híbridos de milho (Tork, -1; e P30F53, 1).

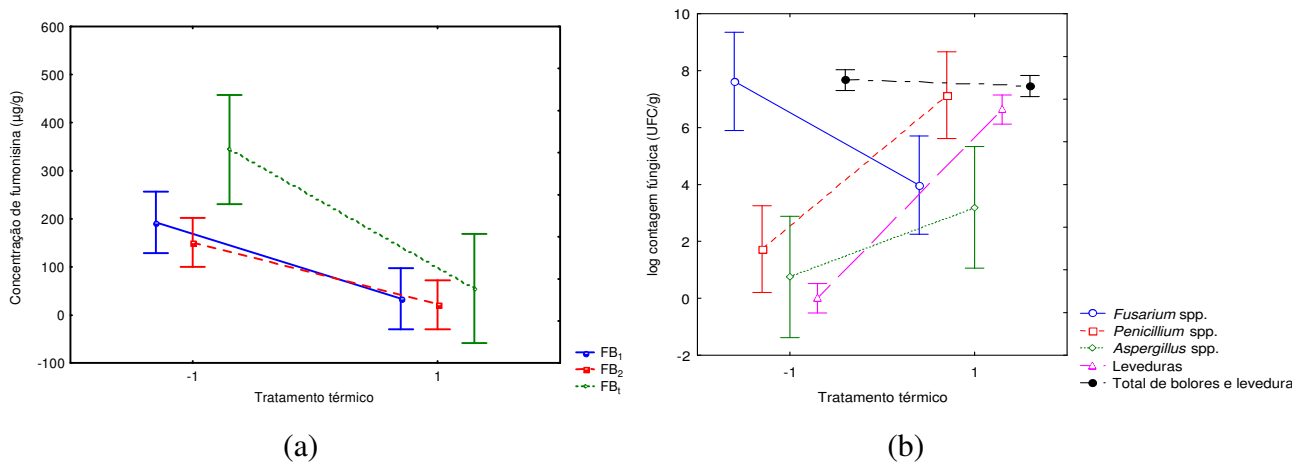


Figura 2. Produção de fumonisinas (a) e crescimento fúngico (b) em função da aplicação do tratamento térmico (121 °C/20 min.; com, -1; e sem, 1).

76 "Hwo qpkup" r tqf wevkp" cpf "Hwuctkwo "xgt vekrkqkf gu" eqwpv" cu" c "hwpevkp" qh' o qkuwtg" eqvpgpv" vgo r gtcwtg" cpf "kpqewwo "qp" eqtp" i tckp" qh' y q" j { dtkf u"

Abstract This study describes the effect of moisture content, temperature and inoculum concentration of *Fusarium verticillioides* on fungal count and fumonisin production on sterile corn. It was possible to build mathematical models by developing a central composite design in two hybrids (Tork and P30F53) with corn moisture content adjusted to 15-30 %, *F. verticillioides* inoculum to 10^3 - 10^7 propagules mL^{-1} and incubation at 15-30 °C for 20 days. The models demonstrated that the variable concentration of *F. verticillioides* inoculum had no significant effect on fungal count on Tork hybrid, but exerted a negative quadratic effect on P30F53 hybrid. The inoculation of 10^5 propagules mL^{-1} *F. verticillioides* provided the highest fumonisin production. Moisture content exerted a high effect on *F. verticillioides* count, the highest values were obtained at 27-30 % under 27-30 °C and 15-22.5 °C for the P30F53 and Tork hybrids, respectively. The variable temperature showed the highest influence on fumonisin production, and the highest levels, i.e., $121.5 \mu\text{g g}^{-1}$ (Tork hybrid) and $405.3 \mu\text{g g}^{-1}$ (P30F53 hybrid), were obtained with 22.5 % moisture content at 22.5 °C and 10^5 *F. verticillioides* propagules mL^{-1} inoculated on corn. The knowledge of critical points for fungal growth and fumonisin production helps taking preventive measures for minimizing contamination in the corn producing chain.

Keywords: Mycoflora Corn Hybrid Inoculum.

Introduction

Fumonisin are a group of mycotoxins produced mainly by *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (= *F. moniliforme* Sheldon) and *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg [6], which are frequently isolated from corn grain [16, 2]. Among 28 fumonisin analogs, fumonisin B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) and B₃ (FB₃) are produced in significant amounts under natural conditions. FB₁ usually accounts for 70 % of total fumonisin content detected in naturally contaminated foods and feeds [24]. Food contamination by fumonisins has been associated with several diseases in animals and humans [28]. Fumonisin cause leukoencephalomalacia in equines [50], pulmonary edema in swine, hepatic cancer in mice [36] as well as reduction of growth, heart diseases, immune deficiency, and degenerate necrosis of the liver in poultry [27]. Their high levels in corn-based food may be associated with human esophageal cancer in South Africa [49, 43] and China [54], and is also a potential risk factor for primary liver cancer [52]. Recently, it has been shown that maternal consumption of FB₁- contaminated corn during early pregnancy was associated with increased risk for neural tube defects in human populations that rely mainly on corn as a dietary staple [15].

The high frequency of corn contamination by *F. verticillioides* is a concern since the discovery of fumonisins [14, 46]. In Brazil, surveys are conducted about fumonisins contamination [19, 38], and some sporadic cases of animal intoxication have been reported [50]. Fumonisin contamination was detected in 90 % corn samples from Paraná, Mato Grosso do Sul and Goiás States in Brazil with FB₁ and FB₂ levels ranging from 0.60 to 19.13 µg g⁻¹ [19]. Corn samples from South Brazil and feed from different farms and agricultural industries showed FB₁ contamination in 32 % samples, with levels ranging from 0.08 to 78.92 µg g⁻¹ [29]. In corn processing industry in the Northern region of Paraná State, Brazil (2004 crop), fumonisins were detected in 98.9 % and 95 % of the reception and pre-drying samples with mean levels of 1.31 µg g⁻¹ and 1.36 µg g⁻¹, respectively [33].

Fungal growth and mycotoxin production in grain are influenced by intrinsic factors, i.e., those directly related to the substrate, such as moisture and nutrient content, pH and genetic characteristics, or by extrinsic factors, i.e., those related to the environment, such as temperature, relative humidity and rainfall [11]. Water activity and temperature are probably the most important ecological determinants, influencing directly on interactions with other fungi, on ability to produce spores and on metabolic activity, mainly concerning mycotoxin production [25]. According to Marín et al. [32], the optimum range for *F. verticillioides* growth is 22.5 to 27.5 °C and 0.98 water activity. Alberts et al. [1], Velluti et al. [53] and Bernd et al. [7] reported greater growth of this species at 25 °C, however there was high fumonisin production at 20 °C [46, 7].

Taking into account the high resistance of fumonisin to chemical and physical treatments applied in food processing, the adequate monitoring throughout corn producing chain combined to preventive measures are essential for ensuring product quality and safety. Although other parameters (atmosphere storage, anti-fungal agents, agronomic practices) contribute to fungal growth and mycotoxin production, the study on fundamentals factors (moisture content and temperature) contribute to minimizing contamination and helps in the knowledge of critical points for fumonisin production by specific strains. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of temperature, moisture content and inoculum concentration on *F. verticillioides* growth and fumonisin production.

Material and Methods

Corn Samples

Corn grains used were simple hybrid Tork (Syngenta®) and simple hybrid P30F53 (Pioneer®), both belonging to 2007 crop and provided by Agronomic Institute of Paraná, Brazil (IAPAR-PR). In order to eliminate the competitive mycoflora, Tork hybrid grains, which remained stored at 5 °C in raffia bags until further use, were subjected to thermal treatment at 121 °C for 25 minutes. The P30F53 hybrid grains were sterilized by 10 kGy of γ -irradiation by Companhia Brasileira de Esterilização (CBE), Piracicaba- SP, Brazil [5], and stored in plastic bags containing 500 g each at 5 °C until further use.

F. verticillioides Strain

F. verticillioides 103F strain isolated from corn feed samples was morphologically identified at the Science University of Tokyo, Japan. Three culture media were used to isolate *Fusarium* species from feed samples, i.e., peptone pentachloronitrobenzene agar [34], dichloran chloramphenicol peptone agar [3] and PCNB 2-amino butane medium [21]. A 0.5 mL portion of feed sample suspension diluted in water (10^{-1} to 10^{-4}) was plated onto the agar surface in duplicate, and colonies from each plating were transferred to potato dextrose agar slant. Then *Fusarium* sp.-like colonies were single-spored, inoculated into carnation leaf agar (CLA) medium [13] and identified according to Nelson, Toussoun and Marasas [35].

Preparation of Conidia Suspension

F. verticillioides 103F was grown on potato dextrose agar (PDA) and incubated at 25 °C for 15 days. Subsequently, conidia suspensions were prepared by adding sterile distilled water containing 0.1 % Tween 80. The conidial count was performed in a Neubauer chamber, preparing a serial dilution from 10^3 to 10^7 conidia mL⁻¹.

Corn Inoculation and Incubation

Aliquots of 500 g corn subjected to heat treatment at 121 °C for 25 minutes (Tork hybrid) and subjected to γ irradiation at 10 kGy dose (P30F53 hybrid), both in 1000 mL flasks, had moisture adjusted to 15, 18, 22.5, 27 and 30 % by adding sterile distilled water, and the corresponding water activities are shown in Fig. 1. The flasks, which also contained 0.15 % sterile soil [39, 7] were inoculated with *F. verticillioides* suspension 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 and 10^7 propagules mL⁻¹ and incubated at 15, 18, 22.5, 27 and 30 °C for 20 days. The flasks

were shaken manually every 7 days of incubation in order to obtain a better distribution of fungal growth. Microbiological analysis and fumonisin quantification were carried out in corn grains before (time zero - t_0) and after experiment time period (20 days - t_{20}).

Experimental Design

In order to analyze the combined effect of the variables, moisture content (%), incubation temperature ($^{\circ}\text{C}$) and *F. verticillioides* inoculum concentration (propagules mL^{-1}), on *Fusarium* sp. growth on dynamics of fumonisin production (FB_1 , FB_2 and FB_{total}), a statistically designed experiment was established, in response surface methodology, central-type rotational 2nd order. This design had two replications at the central point and six axial. The variables were established with three levels coded as -1, 0, +1. The six levels of axial variables were coded as $-\alpha$ and $+\alpha$, where α is the function value of the number of independent variables (k), defined as the Equation 1:

$$\alpha = (2^k)^{1/4} = (2^3)^{1/4} = 1,682 \quad \text{Equation 1}$$

Sixteen treatments were performed, resulting from the use of complete factorial design. Eight treatments were composed of eight factors (combinations of levels -1 and +1), six axial treatments (one variable at $\pm \alpha$ level and another at level 0) and two central points.

Using analysis of variance (ANOVA) at 5 % probability, the second order equation was adopted to establish the mathematical predictive models to the responses from Table 1, whose general Equation 2 can be written as follows:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

Equation 2

where:

Y_i = general response function; X_1 , X_2 , X_3 = decoded values of independent variables; β_0 = coefficient of plane intersection with the axis response; β_1 , β_2 , β_3 = linear coefficients estimated by the least squares method; β_{11} , β_{22} , β_{33} = quadratic coefficients of variables; β_{12} , β_{13} , β_{23} = coefficients of interaction between independent variables.

The model coefficients and their significance related to the factors were determined by adjusting the models to the data set, using analysis of variance (ANOVA). In order to verify that there was not lack of fit of data to the model built, the mean square due to pure error was tested. The adequacy of the proposed models were assessed by comparing the proportion of variance explained by the model, i.e., by examining the coefficient of determination (R^2) and the minimum mean square error.

The data for the mathematical models development were obtained by subtracting the parameter values of 20 day incubation time (t_{20}) from the values of the initial condition of corn (time zero; t_0), whose results are shown in Table 1.

Data processing and statistical analysis were performed using Statistica Software, version 6.0, with the coded independent variables. CFU g^{-1} data were transformed prior to analysis by $y = \log(CFU\ g^{-1})$. The response surface graphs were drawn by the mathematical model, maintaining the response in the Z axis and X and Y axes representing the independent variables, while the other variables were kept at the central point (corresponding to the coded level 0).

Microbiological Analysis – Total Fungal/ yeast Colony Count

Subsamples (10 g) of ground corn were blended with 90 mL sterile 0.1 % peptone water (v/v) and serial dilutions (10^{-1} to 10^{-6}) were carried out with 9.0 mL of the same diluent. An aliquot of 0.1 mL of each dilution was plated on potato dextrose agar (PDA, pH 4.0). The plates were incubated at 25 °C for 5 days. After total fungal colony count, genera were identified according to Nelson, Toussoun and Marasas [35] and Samson, Hoeskstra and Frisvad [45].

Fumonisin Analysis

Fumonisin B₁ and B₂ were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC), according to Shephard et al. [48] with some modification [51]. A 10 g sample of the ground kernels was mixed with 30 mL methanol–water (3:1, v/v). After standing for 10 min at room temperature, the suspension was shaken at 150 r.p.m for 1 hour at 10 °C. After filtration, the extract (1.0 mL) was applied to a preconditioned Sep-Pak plus QMA (Waters Co., Ltd). After washing the cartridge with 6 mL methanol–water (3:1) followed by 3 mL methanol (J.T. Baker, USA), fumonisins were eluted with 10 mL methanol containing 0.5 %

acetic acid. The eluate was evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 40 °C, the residue was dissolved in 800 µL methanol–water (3:1) and a 200 µL aliquot dried under nitrogen. After derivatization with 200 µl O-phthalaldehyde (OPA, Sigma Co., USA) reagent (40 mg OPA, 1 mL methanol, 5 mL 0.1 mol L⁻¹ sodium borate and 50 µL 2-mercaptoethanol), high-performance liquid chromatography (HPLC) injections were made within 1 min. Fumonisin were analysed by a reversed-phase isocratic HPLC system (Shimadzu LC-10 AD pump and RF-10A XL fluorescence detector), using a Luna 5 µ column C₁₈ (4.6 x 250 mm; Phenomenex®). Excitation and emission wavelengths were 335 and 450 nm, respectively. The eluent was CH₃OH–0.1M NaH₂PO₄ (J.T. Baker, USA) (80:20, v/v) adjusted to pH 3.3 with o-phosphoric acid (J.T. Baker, USA) at 1 mL min⁻¹ flow rate. The detection limits for FB₁ and FB₂ were 27.5 and 35.3 ng g⁻¹, respectively. The recoveries of FB₁ and FB₂ from spiked corn in the range 100–400 ng g⁻¹ FB₁ and 250–450 ng g⁻¹ FB₂ averaged 95.6 % (mean CV=8 %) and 96.9 % (mean CV=10 %), respectively, based on duplicate spiking and triplicate analyses.

Results and Discussion

Table 1 shows the *F. verticillioides* 103F count and fumonisin production in two corn hybrids (Tork and P30F53) after 20 days incubation (t₂₀) at different moisture content (15-30 %), temperature of incubation (15-30 °C) and inoculum *F. verticillioides* concentration (10³-10⁷ propagules mL⁻¹). In addition, Table 1 shows the initial contamination (t_i) of corn grains by *Fusarium* sp. and fumonisins before the thermal and irradiation treatments, and after these treatments, i.e., before inoculation (t₀).

The pre-existing mycoflora in corn grains was completely eliminated in both treatments (Table 1). There was a decrease of 17.3 % fumonisin content, i.e., from 6.11 µg g⁻¹ to 5.05 µg g⁻¹, when the grains were subjected to thermal treatment under humid heat at 121 °C for 25 minutes (Tork hybrid). This result is in agreement with Jackson et al. [20], who observed 16 % reduction in fumonisin levels in a corn product by applying heat treatment at 175 °C for 20 min. On the other hand, there was a decrease of 55.4 %, i.e., from 4.42 µg g⁻¹ to 1.97 µg g⁻¹, when irradiation at 10 kGy was used (P30F53 hybrid). Ferreira-Castro et al. [12] reported a reduction of 62.5 % FB₁ levels when applied a 10 kGy dose of gamma radiation in corn. Aziz et al. [5], studying the effect of gamma radiation on *Fusarium* sp. growth and FB₁ levels, showed that the viable cells count decreased significantly with increase in radiation

dose, and 6 kGy was the lethal dose in wheat and corn, while a dose of 7 kGy was necessary for complete FB₁ degradation in these cereals.

For quadratic models construction, using data from Table 1, corresponding to the end of the incubation period (20 days), the effects (linear, quadratic and interactions between independent variables) of moisture content, temperature and *F. verticillioides* inoculum concentration on fungal growth and fumonisin production were calculated. However, the best models were obtained by analyzing the determination coefficient (R^2) and based on a minimum mean square error. The regression coefficients of the models, as well as the determination coefficients are shown in Table 2. The terms of the models that were not significant were included in residues, since it did not affect the R^2 .

The determination coefficients (R^2 , Table 2) for *F. verticillioides* count and fumonisin production in Tork and P30F53 hybrids indicate that over 82 % of the variation of these parameters was explained by the applied model, taking into account that the lowest determination coefficient was 0.82, which is concerning FB₂ model for P30F53 hybrid.

Regarding *F. verticillioides* model, when the experiment was performed with P30F53 hybrid, the moisture content (X_1) and temperature (X_2) exerted the highest effect on the response (Table 2), since the largest absolute numerical values of this model were concerning these variables in linear terms ($X_1 = 0.58$ and $X_2 = 0.41$). There was a positive linear relationship ($p < 0.001$) between these variables and the moisture content exerted greater influence. Therefore, fungal count was directly proportional to the increase of these variables, as shown in Fig. 2A(a), where the highest *F. verticillioides* count was observed when the moisture content and temperature incubation were in the upper levels of the experiment design, i.e., 27-30 % ($a_w = 0.96 - 0.98$, Fig. 1) and 27-30 °C, respectively. The increase in water activity (> 0.925) favored the *F. verticillioides* and *F. proliferatum* growth in sterile corn at 30 °C [30, 31].

As shown in Table 2, similar results concerning higher effects (linear and positive) of moisture content ($p < 0.001$) and temperature ($p < 0.001$) on *F. verticillioides* count was observed when the experiment was performed with Tork hybrid, since the highest absolute numerical values were of these variables in the linear term of the model ($X_1 = 1.24$ and $X_2 = 0.82$), and similarly to P30F53 hybrid, the moisture variable had more influence. However, there was also a significant negative effect of the interaction between the moisture content and temperature ($p < 0.001$), and this was the second coefficient of highest magnitude of the model ($X_1.X_2 = -1.00$), which show an increase in fungal count with moisture content adjusted in upper levels of experimental design, i.e., 27-30 % ($a_w = 0.96-0.98$, Fig. 1) and temperature in

lower levels, i.e., 15-22.5 °C, as displayed in Fig. 2A(b). The differences in optimum conditions for fungal count obtained from two hybrids (Tork and P30F53) may be assigned by different genetic characteristics of corn and also by different sterilization methods used in this work, i.e., heat treatment (121 °C / 25 min.) for Tork hybrid and gamma irradiation at 10 kGy dose for P30F53 hybrid, which alter the structure of corn differently.

Pitt and Hocking [41] showed that the optimum range for *F. verticillioides* growth was between 22.5 and 27.5 °C. Alberts et al. [1] and Velluti et al. [53] reported greater growth at 25 °C compared to 20 °C and 15 °C, occurring a decrease at 30 °C. Marín et al. [31] reported the optimum water activity (0.98) for *F. verticillioides* and *F. proliferatum* growth isolates from corn, while a significant reduce occurred at 0.92 a_w . Moreover, Samapundo et al. [44] reported that water activity had a greater influence on *F. verticillioides* 25N and *F. proliferatum* 73N growth than temperature.

The variable concentration of *F. verticillioides* inoculum had no significant effect ($p > 0.05$) on fungal count in Tork hybrid, i.e., *F. verticillioides* count was not influenced by the inoculum concentration, as can be seen in Fig. 2B(d). But when the experiment was carried out with P30F53 hybrid, the inoculum concentration exerted a positive linear effect ($p < 0.05$) and negative quadratic effect ($p < 0.05$), and the last one was of higher magnitude, indicating that the highest fungal count occurred when the inoculum was used in intermediate levels of experiment design (10^5 - 10^6 propagules mL^{-1}), Fig. 2B(c).

The fumonisin production on Tork hybrid was significantly affected ($p < 0.001$), in higher magnitude, by the quadratic coefficients of temperature, moisture content and concentration of *F. verticillioides* inoculum (Table 2); and by the linear coefficient of moisture content ($p < 0.05$). The influence of the quadratic coefficients was negative, being temperature and inoculum concentration the variables that had higher magnitudes. The most significant effect of temperature variable on fumonisin production and moisture content on *F. verticillioides* count are in agreement with data reported by Bernd et al. [7], evaluating the growth of the same *F. verticillioides* strain. Hinojo et al. [18], using rice as substrate for *Gibberella fujikuroi* inoculation, observed that fumonisin production was more significantly influenced by temperature than by water activity, whereas the highest levels were detected at 20 °C compared to other temperatures (28 and 37 °C).

Fig. 3A(a, b, c) designed using the equations described in Table 2 for fumonisin production in Tork hybrid, clearly shows the influence of the factors mentioned above (temperature versus concentration of *F. verticillioides* inoculum). The highest fumonisin production occurred when the independent variables (moisture content, concentration of *F.*

verticillioides inoculum and temperature incubation), were adjusted under intermediate levels in experimental design, i.e., 22.5 % ($a_w = 0.96$, Fig. 1), 10^5 propagules mL^{-1} and 22.5 °C, respectively.

There are several studies on *F. verticillioides* inoculation in corn for secondary metabolite production. Dilkin et al. [10] showed that the optimum temperature for FB_1 and FB_2 production was 24.5 and 24.3 °C, respectively by three *F. verticillioides* strains (LAMIC 2999/96, 113F and NRRL 13616). Scott [46] found that 20 °C was optimum for FB_1 production by the same specie. The optimal temperatures for fumonisin production ratify the researches that have shown an increase in fumonisin levels in temperate regions [19].

Concerning the use of P30F53 hybrid in the experiment, the fumonisin production models, shown in Table 2, demonstrated that there was a positive linear effect of moisture content in FB_1 and FB_{total} production, however, this was not observed for FB_2 production, where no linear term had a significant effect. However, this influence was less significant than the importance exerted by quadratic coefficients in fumonisin production, where the moisture content and temperature were the variables that had the highest effects, which were negative. For FB_1 production, the effect of inoculum concentration also had significant negative effect on its quadratic term, but in lesser magnitude than the other quadratic coefficients (moisture content and temperature). Le Bars et al. [26] suggested that moisture content was not an important factor in fumonisin production in French corn grain stored for up to 10 weeks, but they only studied FB_1 production in corn with a limited moisture content range (> 27 %). However, intermediate moisture content is particularly critical in partially dried maize where growth and fumonisin production by *F. verticillioides* can easily occur [30]. Marín et al. [30] observed a significant effect of temperature and moisture content on fumonisin production by different strains and reported low FB_1 and FB_2 levels in 0.925 a_w at 25 and 30 °C, but the maximum fumonisin production was observed at 0.956 a_w at 25 °C compared to 30 °C and lower a_w .

The best conditions for toxin production in P30F53 hybrid were the same as for Tork hybrid, i.e., grains submitted to intermediate levels of independent variables - 22.5 % moisture content ($a_w = 0.96$, Fig. 1), 10^5 *F. verticillioides* propagules mL^{-1} and 22.5 °C temperature incubation. Table 1 shows that the treatments 13, 14, 15 and 16 had the highest yields of $\text{FB}_1 + \text{FB}_2$ (FB_{total}), i.e., 324.10 $\mu\text{g g}^{-1}$, 425.20 $\mu\text{g g}^{-1}$, 388.91 $\mu\text{g g}^{-1}$, 405.30 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectively, on P30F53 hybrid. The influence of moisture content and temperature on FB_1 , FB_2 and FB_{total} production is shown in Fig. 3B(d, e, f), which was built according to the models showed in Table 2 for P30F53 hybrid.

The optimum conditions for fumonisin production in both hybrids, Tork and P30F53, are not related to the higher amounts of *F. verticillioides* propagules inoculated on the corn substrate (10^7 propagule mL⁻¹), but to the intermediate level of the experiment (10^5 propagule mL⁻¹). These results are in agreement with those reported for *A. parasiticus* [47], where a gradual increase in aflatoxin production was observed with a decrease in the inoculum size from 10^5 to 10^1 spores mL⁻¹; and for *A. flavus* [37] where a reduction in inoculum size by serial dilution (3–4 log cycles) resulted in 3–12 fold increase in aflatoxin production. Similarly, Chelack et al. [9] showed an enhancement of ochratoxin A production when the barley was inoculated with 10^2 conidia per g of *A. alutaceus* than when it was inoculated with 10^5 conidia g⁻¹. The toxin production is apparently suppressed when the number of inoculated spores per unit volume of substrate exceeds a certain level [23].

The growth in fungi is apical, and the apex is constantly supplied with the nutrients from the rest of the mycelium for cell multiplication and branching [42]. Studies by Jinks [22] suggested that aflatoxin production in a medium might be associated with the mycelial branching and differentiation. If the initial inoculum is large in a fixed volume of the medium, the growth should mainly be due to the primary growing tips [8]. Hyphal fusion, which is common in Deuteromyces [40], will also be faster in a larger inoculum. The depletion of nutrients and the release of substances may also influence the lateral branching [17]. With smaller populations, these limitations are reduced to afford more lateral branching or secondary mycelial growth, which may in turn result in higher yield of mycotoxins in these cultures.

Inoculum size suggested to be the cause of increased mycotoxin production in a number of reports, plays a large part in determining the ultimate level of mycotoxin production, along with the water activity and the number and variety of competing natural moulds on the grain surface [37, 47, 9].

Understanding how abiotic factors (temperature and moisture) influence the *Fusarium* sp. growth and secondary metabolite production are essential to develop strategies to minimize fumonisin production in corn intended for human and animal consumption, preventing diseases and economic losses.

Acknowledgements The authors thank the CNPq (the Brazilian Government organization for grant aid and fellowship to Brazilian researchers) in association with MAPA (Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply, the Araucária Foundation (Paraná State grant), Paraná

Fund/SETI and CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) – Nanobiotechnology Network Program (04/CII-2008) for financial support. The CNPq/Pq Scholarship is greatly appreciated by E.Y.S.Ono and E.Y.Hirooka.

References

1. Alberts JF, Gelderblom WCA, Thiel PG, Marasas WFO, Van Schalkwyk DJ, Behrend Y. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol.* 1990;56:1729–33.
2. Almeida AP, Corrêa B, Direito GM, Fonseca H, Fancelli AL, Ortega E. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. *J Agric Food Chem.* 2002;50:3877-82.
3. Andrews S, Pitt JI. Selective medium for *Fusarium* species and dermatiaceous hyphomycetes from cereals. *Appl Environ Microbiol.* 1986;51:1235-8.
4. Aziz NH, Matter ZA, Shahin AAM. Detection of fumonisin B₁ produced by *Fusarium moniliforme* and its control by gamma radiation and food preservatives. *Nat Egypt J Microbiol.* 2005;10:96–107.
5. Aziz NH, El-far FM, Shahin AAM, Roushy SM. Control of *Fusarium* moulds and fumonisin B₁ in seeds by gamma-irradiation. *Food Control.* 2007; 18:1337–42.
6. Bacon CW, Tates IE, Hinton DM, Meredith F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environ. Health Perspect.* 2001;109:325–32.
7. Bernd LP, Curioni AA, Basso F, Furlong EB, Ono EYS, Gerage AC, Hirooka EY. Modelagem matemática para fumonisininas em milho e perfil cromatográfico de metabólitos produzidos por *Fusarium verticillioides*. *Semina: Cienc Agr.* 2008;29:361-78.
8. Burnett JH. *Fundamentals of mycology.* Ed. Edward Arnold Ltd., London, 1968.
9. Chelack WS, Borsa J, Marquadt RP, Frohlich AAJ. Role of the competitive microbial flora in the radiation-induced enhancement of ochratoxin production by *Aspergillus alutaceus* var. *alutaceus* NRRL 3174. *Appl Environ Microbiol.* 1991;57:2492-6.
10. Dilkin P, Mallmann CA, Almeida CAA, Stefanon EB, Fontana FZ, Milbradt EL. Production of fumonisins by strains of *Fusarium moniliforme* according to temperature, moisture and growth period. *Braz J Microbiol.* 2002;33:111-8.

11. Doohan FM, Brennan J, Cooke BM. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *Eur J Plant Pathol*. 2003;109:755–68.
12. Ferreira-Castro FL, Aquino S, Greiner R, Ribeiro DHB, Reis TA, Corrêa B. Effects of gamma radiation on maize samples contaminated with *Fusarium verticillioides*. *Appl Radiat Isotopes*. 2007;65:927–33.
13. Fisher NL, Burgess LW, Toussoun TA, Nelson PE. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathol*. 1982;72:151-3.
14. Gelderblom WCA, Sample E, Marasas WFO. Fumonisin: novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *App Environ Microbiol*. 1988;54:1806-11.
15. Gelineau-Van Waes J, Voss KA, Stevens VL, Speer MC, Riley RT. Maternal Fumonisin Exposure as a Risk Factor for Neural Tube Defects. *Advances Food Nutr Res*. 2009;56:145-81.
16. Gonzalez HH, Resnik SL, Pacin AM. Mycoflora of freshly harvested flint corn from Northwestern Provinces in Argentina. *Mycopathol*. 2000;155:207-11.
17. Gottlieb D. Limited growth in fungi. *Mycol*. 1971;63:619-29.
18. Hinojo MJ, Medina A, Valle-Algarra FM, Gimeno-Adelantado JV, Jiménez M, Mateo R. Fumonisin production in rice cultures of *Fusarium verticillioides* under different incubation conditions using an optimized analytical method. *Food Microbiol*. 2006;23:119-27.
19. Hirooka EY, Yamaguchi MM, Aoyama S, Sugiura Y, Ueno Y. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. *Food Addit Contam*. 1996;13:173-83.
20. Jackson LS, Katta SK, Fingerhut DD, De Vries JW, Bullerman LB. Effects of baking and frying on the fumonisin B₁ content of cornbased foods. *J Agric Food Chem*. 1997;45:4800–5.
21. Jeffries CJ, Boyd AEW, Paterson LJ. Evaluation of selective media for the isolation of *Fusarium solani* var. *coeruleum* and *Fusarium-sulphureum* from soil and potato-tuber tissue. *Ann Appl Biol*. 1984;105:471-81.
22. Jinks JL. Selection for adaptability to new environment in *Aspergillus glaucus*. *J Gen Microbiol*. 1969;20:223-36.
23. Karunaratne A, Bullerman LB. Interactive effects of spore load and temperature on aflatoxin production. *J Food Protect*. 1990;53:227–9.
24. Krska R, Welzig E, Boudra H. Analysis of *Fusarium* toxins in feed. *Anim Feed Sci Technol*. 2007;137:241–64.

25. Lacey J. Water availability and the occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in stored products. In: International Iupac Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, 6. Anais. Tokyo, 1988. pp.186-89.
26. Le Bars P, Le Bars J, Dupuy J, Boudra H. Biotic and abiotic factors in fumonisin B₁ production and stability. J. AOAC Int. 1994;77:517-21.
27. Ledoux DR, Brown TP, Weibking TS, Rottingaus GE. Fumonisin toxicity in broiler chicks. J Vet Diagn Invest. 1992;4:330-3.
28. Lino CM, Silva LJ, Pena AS. Fumonisin: Presença em Alimentos, Implicações na Saúde e Aspectos Legislativos. Rev Port Cienc Veter. 2004;90:181 – 92.
29. Mallmann CA, Santurio JM, Almeida CAA, Dilkin P. Fumonisin B₁ levels in cereals and feeds from southern Brazil. Arq Inst Biol. 2001;68:41-5.
30. Marín S, Sanchis V, Vinas I, Canela R, Magan N. Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B₁ and B₂ production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* on maize grain. Lett App Microbiol. 1995a;21:298-301.
31. Marín S, Sanchis V, Magan N. Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. Can J Microbiol. 1995b;41:1063-70.
32. Marín S, Sanchis V, Arnau F, Ramos AJ, Magan N. Colonisation and competitiveness of *Aspergillus* and *Penicillium* species on maize grain in the presence of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. Int J Food Microbiol. 1998;45:107-17.
33. Moreno EC, Garcia GT, Ono MA, Vizoni E, Kawamura O, Hirooka EY, Ono EYS. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. Food Chem. 2009;116:220-6.
34. Nash SM, Snyder WC. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. Phytopathol. 1962;52:567-72.
35. Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, 1983.
36. Norred WP, Voss KA. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. J Food Protection. 1994;57:522-7.
37. Odamtten GT, Appiah V, Langerak DI. Influence of inoculum size of *Aspergillus flavus* link on the production of aflatoxin B₁ in maize medium before and after exposure to combination treatment of heat and gamma radiation. Int J Food Microbiol. 1987;4:119-27.

38. Ono EYS, Fungaro MHP, Sofia SH, Figueira ELZ, Gerage AC, Ichinoe M, Sugiura Y, Ueno Y, Hirooka EY. Trends of fumonisin contamination and animal intoxication through monitoring 1991 to 1997 corn crop in the State of Paraná, Brazil. *Mycopathol.* 2004;158:451-455.
39. Palacios-Cabrera HA, Taniwaki MH, Menezes HC, Vicentini MC, Iamanaka BT, Taniwaki NN. Optimisation of the inoculation of *Aspergillus ochraceus* in coffee for isothermal studies simulating storage and marine transport of raw coffee. 19th ASIC Coffee Conference, Trieste, Italy, 14-18 May, 2001.
40. Park D, Robinson PM. In Cutter EG, editor. Trends in plant morphogenesis. Longmans, London.; 1966. pp. 24-44.
41. Pitt JI, Hocking AD. *Aspergillus* and related teleomorphs. In: Pitt JI, Hocking AD., editors. Fungi and Food. Fumonisin in Food Spoilage, Academic Press, London; 1997. pp. 339–416.
42. Putzke J, Putzke MTL. Os reinos dos fungos. Ed. Santa Cruz do Sul; 2002.
43. Rheeder JP, Marasas WFO, Thiel PG, Sydenham EW, Shephard GS, Van Schalkwyk DJ. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human oesophageal cancer in Transkei. *Phytopathol.* 1992;82:353–7.
44. Samapundo S, Devlieghere F, De Meulenaer B, Geeraerd AH, Van Impe JF, Debevere JM. Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. *Int J Food Microbiol.* 2005;105:35-52.
45. Samson RA, Hoeskstra ES, Frisvad JC. Introduction to food-borne fungi. 4 ed. The Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures; 1995.
46. Scott PM. Fumonisin. *Inst J Microbiol.* 1993;18:257-70.
47. Sharma A, Behere AG, Padwal Desai SR, Nadkarni GB. Influence of inoculum size of *Aspergillus parasiticus* spores on aflatoxin production. *Appl Environ Microbiol.* 1980;40:989–93.
48. Shephard GS, Sydenham EW, Thiel PG, Gelderblom WCA. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Liq Chromat.* 1990;13:2077-87.
49. Sydenham EW, Thiel PG, Marasas WFO, Shephard GS, Schalkwyk DJ, Kock KR. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, southern Africa. *J Agric Food Chem.* 1990;38:767-71.

50. Sydenhan EW, Marasas WFO, Shephard GS, Thiel PG, Hirooka EY. Fumonisin concentration in Brazilian feeds associated with field outbreaks of animal mycotoxicosis. *J Agr Food Chem.* 1992;40:994-7.
51. Ueno Y, Aoyama S, Sugiura Y, Wang DS, Hirooka EY, Hara S, Karki T, Chen G, Yu SH. A limited survey of fumonisin in corn and corn-based products in Asian countries. *Mycotoxin Res.* 1993;9:27-34.
52. Ueno Y. Risk of multi-exposure to natural toxins. *Mycotoxins.* 2000;50:13-22.
53. Velluti A, Marín S, Bettucci L, Ramos AJ, Sanchis V. The effect of fungal competition of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium graminearum* on fumonisin B₁ and zearalenone formation. *Int J Food Microbiol.* 2000;59:59-66.
54. Zhang H, Nagashima H, Goto T. Natural occurrence of mycotoxins in corn samples from high and low risk areas for human esophageal cancer in China. *Mycotoxins.* 1997;44:29-35.

Table 1 Codified /real variables for experimental design with Tork corn hybrid, subjected to heat treatment (121 °C/25min.), and P30F53 hybrid submitted to γ -irradiation (10 kGy) for *F. verticillioides* count and fumonisins production after 20 day of incubation

Treatments	Codified Variables			Real Variables			Hybrids							
	x_1^*	x_2^*	x_3^*	X_1^*	X_2^*	X_3^*	Tork			P30F53				
							<i>Fusarium</i> sp.	FB ₁ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	FB ₂ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	FB _{total} ($\mu\text{g g}^{-1}$)	<i>Fusarium</i> sp.	FB ₁ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	FB ₂ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	FB _{total} ($\mu\text{g g}^{-1}$)
1	-1	-1	-1	18	18	10 ⁴	4.0 x 10 ²	1.41	0.99	2.40	1.7 x 10 ⁶	9.21	4.79	14.00
2	-1	-1	1	18	18	10 ⁶	5.2 x 10 ³	3.71	3.02	7.73	2.1 x 10 ⁶	8.43	3.81	12.24
3	-1	1	-1	18	27	10 ⁴	8.9 x 10 ⁶	3.53	2.24	5.77	7.3 x 10 ⁶	5.93	2.65	8.59
4	-1	1	1	18	27	10 ⁶	3.5 x 10 ⁶	2.41	1.56	3.97	3.4 x 10 ⁷	8.23	3.70	11.93
5	1	-1	-1	27	18	10 ⁴	4.5 x 10 ⁷	2.55	3.12	5.67	3.7 x 10 ⁷	66.00	38.08	104.08
6	1	-1	1	27	18	10 ⁶	4.1 x 10 ⁷	21.52	28.92	50.44	5.3 x 10 ⁷	65.61	43.33	108.95
7	1	1	-1	27	27	10 ⁴	1.6 x 10 ⁷	0.57	0.55	1.12	2.1 x 10 ⁸	67.71	37.27	104.99
8	1	1	1	27	27	10 ⁶	1.5 x 10 ⁷	0.45	0.39	0.84	4.5 x 10 ⁸	43.76	22.27	66.03
9	-1.68	0	0	15	22.5	10 ⁵	1.0 x 10 ⁴	2.74	2.06	4.80	4.8 x 10 ⁶	2.05	1.69	3.74
10	1.68	0	0	30	22.5	10 ⁵	1.7 x 10 ⁸	52.71	41.47	94.18	2.0 x 10 ⁸	50.82	27.33	78.15
11	0	-1.68	0	22.5	15	10 ⁵	2.9 x 10 ⁵	2.58	1.81	4.39	9.4 x 10 ⁶	22.05	11.55	33.60
12	0	1.68	0	22.5	30	10 ⁵	2.9 x 10 ⁸	4.75	3.61	8.36	1.7 x 10 ⁸	13.86	11.48	25.34
13	0	0	-1.68	22.5	22.5	10 ³	1.3 x 10 ⁷	2.29	1.67	3.96	1.3 x 10 ⁷	182.14	141.95	324.10
14	0	0	1.68	22.5	22.5	10 ⁷	6.8 x 10 ⁷	8.47	6.77	15.24	7.8 x 10 ⁷	176.44	248.75	425.20
15	0	0	0	22.5	22.5	10 ⁵	6.7 x 10 ⁷	69.93	53.13	123.06	5.8 x 10 ⁷	240.09	148.82	388.91
16	0	0	0	22.5	22.5	10 ⁵	6.0 x 10 ⁷	72.47	49.08	121.55	2.3 x 10 ⁸	254.12	151.18	405.30
t _i	-	-	-	-	-	-	1.5 x 10 ⁵	3.99	2.12	6.11	3.6 x 10 ⁴	2.97	1.45	4.42
t ₀	-	-	-	-	-	-	ND	2.99	2.06	5.05	ND	1.23	0.74	1.97

* x_1 e X_1 : Moisture content of corn grains (%); x_2 e X_2 : Temperature incubation (°C); x_3 e X_3 : Inoculum *F. verticillioides* concentration (propagules mL⁻¹).

** t_i = inicial contamination of corn grains (pre-thermal treatment / γ -irradiation); t₀ = corn grain contamination after thermal treatment /radiation (pre-inoculation).

Table 2 Regression coefficient and associated probability (p) of quadratic regression model for *F. verticillioides* count and fumonisin production after 20 day of incubation

Factor	Hybrid					
	Tork			P30F53		
	Regression coefficient	p	R ²	Regression coefficient	p	R ²
<i>F. verticillioides</i>						
Constant	7.45±0.25	***		8.06 ± 0.15	***	
Linear Terms (X)						
X ₁	1.24±0.14	***		0.58 ± 0.06	***	
X ₂	0.82±0.14	***		0.41± 0.06	***	
X ₃	-			0.18±0.06	*	
Quadratic Terms (X ²)			0.93			0.94
X ₁	-0.63±0.15	**		-0.22± 0.07	*	
X ₂	-0.33±0.15	---		-0.18±0.07	*	
X ₃	-	-		-0.22±0.07	*	
Product of terms (X.X)						
X ₁ .X ₂	-1.00±0.18	***		-	-	
FB₁						
Constant	71.6±6.59	***		250.03±13.00	***	
Linear Terms (X)						
X ₁	7.18±2.53	*		21.48±4.99	**	
Quadratic Terms (X ²)			0.89			0.96
X ₁	-16.34±3.07	***		-85.06±6.06	***	
X ₂	-24.87±3.07	***		-88.06±6.06	***	
X ₃	-24.26±3.07	***		-30.90±6.06	***	
FB₂						
Constant	51.28±6.21	***		161.94±17.18	***	
Linear Terms (X)						
X ₁	6.69±2.38	*		12.39±9.68	---	
X ₂	-			-1.77±9.68	---	
Quadratic Terms (X ²)			0.84			0.82
X ₁	-10.82±2.89	***		-61.48±10.68	***	
X ₂	-17.58±2.89	***		-62.54±10.68	***	
X ₃	-17.04±2.89	***		-		
FB_{total}						
Constant	122.87±12.58	***		363.48±26.58	***	
Linear Terms (X)						
X ₁	13.80±4.83	*		33.88±14.99	*	
X ₂	-			-4.51±14.99	---	
Quadratic Terms (X ²)			0.87			0.90
X ₁	-27.14±5.87	***		-133.57±16.53	***	
X ₂	-42.42±5.87	***		-137.63±16.53	***	
X ₃	-41.28±5.87	***		-		

*significant p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; --- non-significant

X₁ = moisture adjusted of grains (15 – 30 %); X₂ = *F. verticillioides* inoculum (10³-10⁷ propagules mL⁻¹); X₃ = temperature (15 – 30 °C).

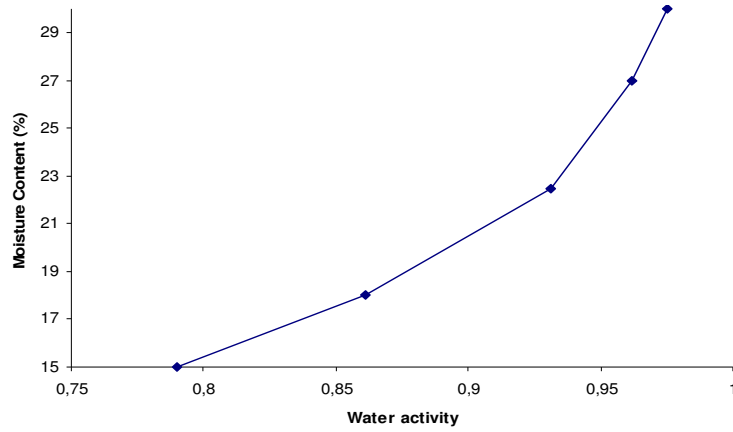


Fig. 1 Isotherm of moisture content adjusted to corn grains and the corresponding water activities.

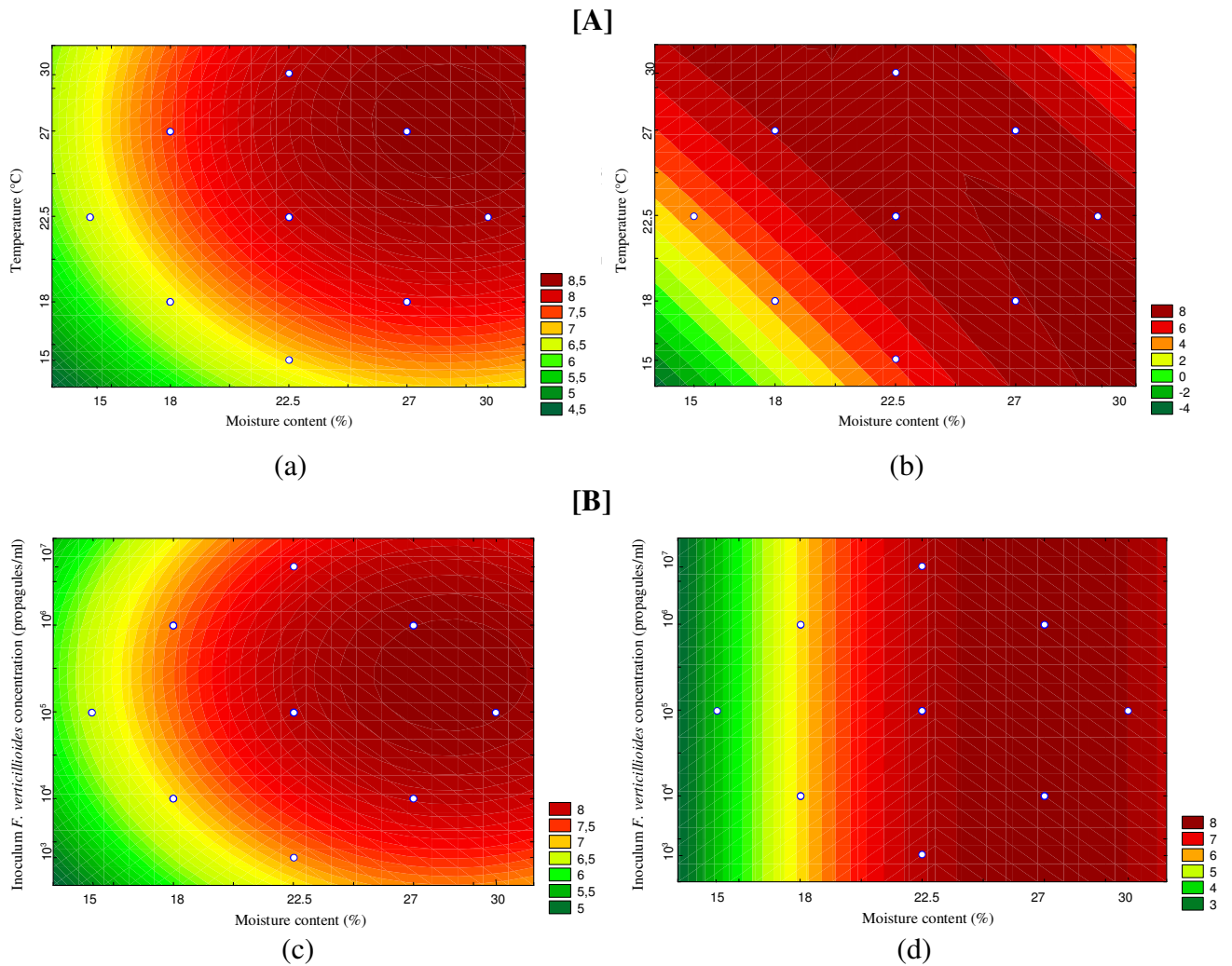


Fig 2 A- Effect of moisture content of corn grain and incubation temperature on *F. verticillioides* count using P30F53 (a) and Tork (b) hybrids. B- Effect of moisture content of corn grain and inoculum concentration on *F. verticillioides* count using P30F53 (c) and Tork (d) hybrids.

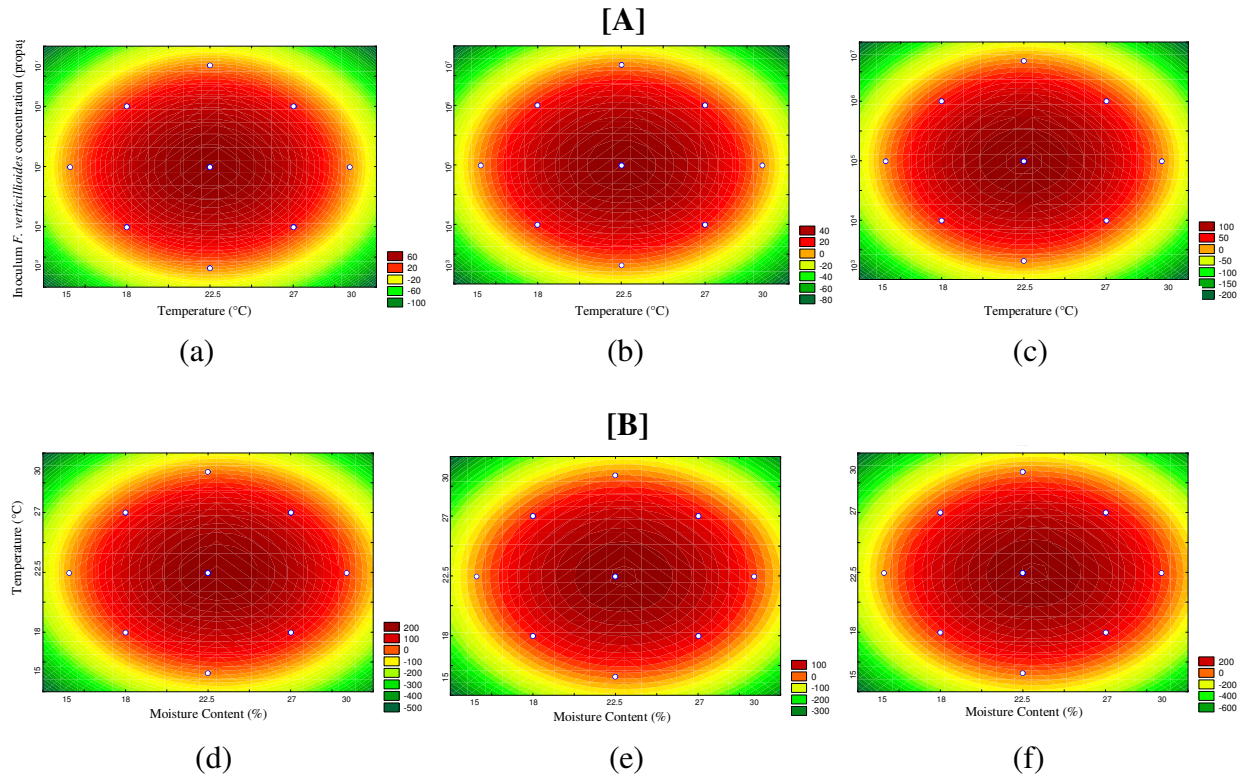


Fig. 3 [A] - Effect of inoculum *F. verticillioides* concentration and incubation temperature on FB_1 (a), FB_2 (b) e FB_{total} (c) production, using Tork hybrid. [B] - Effect of moisture content of corn grain and incubation temperature on FB_1 (d), FB_2 (e) e FB_{total} (f) production, using P30F53 hybrid.

5.5 Kinetics of fumonisin production, *Fusarium verticillioides* count and lipids /proteins changes under in vitro conditions on corn grains

Abstract

Due to the excellent nutritional quality and tropical/subtropical climate of Brazil, corn is constantly subject to contamination by toxigenic fungi, especially *Fusarium verticillioides*, which produce mycotoxins of fumonisins group, capable of cause diseases in human and animals. The work aimed to study the kinetic of fumonisin production and *F. verticillioides* count and assess the correlation between protein and lipids content. Corn grains had moisture adjusted to 15-27%, were inoculated with *F. verticillioides* 10^3 - 10^7 propagules mL^{-1} and incubated under temperature 18-27°C for 20 days. Sampling was done every two days. At the end of incubation period, the highest fumonisins production ($328.04 \mu\text{g g}^{-1}$) was observed in grains with moisture adjusted to 27%, inoculated with 10^4 propagules mL^{-1} and incubated under 27°C. However, throughout the incubation no treatment differed significantly with respect to toxin production, except for treatments 18%, 27°C, 10^4 propagules mL^{-1} and 15%, 22.5°C, 10^5 propagules mL^{-1} , which had the lowest fumonisin levels (0.62 and $1.14 \mu\text{g g}^{-1}$, respectively) and provided none increase fungal growth after adaptation phase. There was a reduction in protein levels in the early incubation, remaining unchanged thereafter. At the beginning of the incubation reduction was observed in lipid levels, with increasing during it.

Keywords: *Zea mays*, fumonisin, protein, lipid.

Introduction

Diseases caused by *Fusarium* sp. in corn, wheat and barley cause significant yield loss worldwide and are therefore of great economic importance. In addition, many species of this genus have the potential to produce a variety of secondary metabolites known as mycotoxins, which cause a potential health risk when contaminated grains are consumed in food for human and animal feed (PLACINTA; D'MELLO; MACDONALD, 1999).

Fumonisin are a group of mycotoxins produced mainly by *F. verticillioides* Sacc Nirenberg (= *F. moniliforme* Sheldon) and *F. proliferatum* (BACON *et al.*, 2001; MILLER, 2001), which are frequently isolated from maize grain (GONZALEZ; RESNIK; PACIN, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2002; DOOHAN; BRENNAN; COOKE, 2003; FERREIRA-CASTRO *et al.*, 2007). Of all the identified fumonisins, fumonisin B₁ (FB₁), fumonisin B₂ (FB₂) and fumonisin B₃ (FB₃) are produced in significant quantities under natural conditions. FB₁ usually represents 70 % of fumonisins total content found in naturally contaminated foods and feeds (AZIZ; MATTER; SHAHIN, 2005). Food contamination by fumonisins has been associated with several diseases in animals and humans, with clinical manifestations resulting from the toxicosis caused by fumonisins, and the organs affected vary from species

to species (LINO; SILVA; PENA, 2004). In horses leads to the emergence of leukoencephalomalacia (SYDENHAM *et al.*, 1992), causes pulmonary edema in swine, hepatic cancer in mice (GELDERBLOM; JASKIEWICZ; MARASAS, 1992), as well as reduction of growth, heart diseases, immune deficiency, and degenerate necrosis of the liver in poultry (LEDOUX *et al.*, 1992). Its high level in corn-based food may be associated with human oesophageal cancer in South Africa (SYDENHAM *et al.*, 1990) and China (ZHANG *et al.*, 1997), and is also a potential risk factor for primary liver cancer (UENO, 2000). Recently, research has shown that maternal consumption of FB₁- contaminated corn during early pregnancy was associated with increased risk for neural tube defects in human populations that rely heavily on maize as a dietary staple (GELINEAU-VAN WAES *et al.*, 2009).

The production of fumonisins in agricultural commodities depends on such factors as geographical region, season, and the environmental conditions under which the particular grain grows, is harvested and stored. Tropical and subtropical regions are the most favorable for fungi development on cereals and production of these toxins (THIEL *et al.*, 1991). Although cereals are important as substrates, moisture level and temperature are the critical abiotic factors regulating the growth of *F. verticillioides* and the production of fumonisins (CAHAGNIER; MELCION; RICHARD-MOLARD, 1995). Low kernel moisture content - 14 % should reduce or prevent toxin production in storage (LE BARS *et al.*, 1994). Information on the minimal, optimal, and maximum temperature for fumonisin production is uncertain; however, the best temperature range for fumonisin production is 20-28 °C (ALBERTS *et al.*, 1990).

Of microorganisms capable of colonizing grains, fungi are more tolerant of low water activity and therefore most important in the deterioration of the grains (CAST, 2003). These organisms are involved in the dry matter losses of grain due to the use of carbohydrates, proteins and lipids reserves, reducing the germination, nutritional value and digestibility. However, a better understanding of metabolic processes used by pathogens during pathogenesis is required.

The work aims to minimize corn contamination, studying the kinetic of fumonisin production and *F. verticillioides* count in corn grains under set conditions of moisture content, temperature and concentration of *F. verticillioides* spores during 20 days, and assess the correlation between changes in protein and lipids content.

Material and Methods

Grain samples

Corn grains were hybrid P30F53 (Pioneer[®]), belonging to 2007 crop, provided by Agronomy Institute of Paraná, Brazil (IAPAR-PR). In order to eliminate the competitive mycoflora, the grains were sterilized by 10 kGy of γ -irradiation by Companhia Brasileira de Esterilização (CBE), Piracicaba- SP, Brazil (Aziz *et al.*, 2007), and stored in plastic bags containing 500 g each at 5 °C until further use.

Fungal isolates

F. verticillioides 103F strain isolated from corn feed samples was morphologically identified at the Science University of Tokyo, Japan. Three culture media were used to isolate *Fusarium* species from feed samples, i.e. peptone pentachloronitrobenzene agar (Nash & Snyder, 1962), dichloran chloramphenicol peptone agar (Andrews & Pitt, 1986) and PCNB 2-amino butane medium (Jeffries, Boyd & Paterson, 1984). A 0.5 mL portion of feed sample suspension diluted in water (10^{-1} to 10^{-4}) was plated onto the agar surface in duplicate, and colonies from each plating were transferred to potato dextrose agar slant. Then *Fusarium* sp.-like colonies were single-spored, inoculated into carnation leaf agar (CLA) medium (Fisher *et al.*, 1982) and identified according to Nelson, Toussoun & Marasas (1983). It was used for the experiment a subculture of this strain dating from 2008 in which proceeded preliminary assessment of its toxicity.

Operating procedure

F. verticillioides 103F was grown on potato dextrose agar (PDA) and incubated at 25 °C for 15 days. Subsequently, conidial suspensions were prepared by adding sterile distilled water containing 0.1 % Tween 80, and preparing a serial dilution from 10^3 to 10^7 propagules mL⁻¹.

Aliquots of 500 g of corn subjected to gamma irradiation at dose of 10 kGy were placed in 1000 mL flask previously added with 0.15 % of sterile soil (Palácios-Cabrera *et al.*, 2001; Bernd *et al.*, 2008), and the moisture content was adjusted to 15, 18, 22.5, 27 % by adding sterile distilled water. Then the flasks in duplicate were inoculated with a suspension of *F. verticillioides* 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 propagules mL⁻¹ and incubated at 18, 22.5, 27 °C for 20 days. The moisture adjusted to the grains, the incubation temperature and concentration of *F. verticillioides* spores for each treatment, which were codified, are shown in Table 1. The grains were evaluated before (time zero - t_0) and during the test period (20 days), proceeding

microbiological/ chemical analysis and fumonisins quantification (HPLC) every two days. The flasks were shaken manually every 7 days of incubation in order to obtain a better distribution of fungal growth.

Microbiological analysis – total fungal/ yeast colony count

Subsamples (10 g) of ground corn were blended with 90 mL sterile 0.1 % peptone water (v/v) and serial dilutions (10^{-1} to 10^{-6}) were carried out with 9.0 mL of the same diluent. An aliquot of 0.1 mL of each dilution was plated on potato dextrose agar (PDA, pH 4.0). The plates were incubated at 25 °C for 5 days. After total fungal colony count, genera were identified according to Nelson, Toussoun and Marasas (1983) and Samson, Hoeskstra and Frisvad (1995).

Fumonisin analysis

Fumonisin B₁ and B₂ were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC), according to Shephard *et al.* (1990) with some modification (UENO *et al.*, 1993). A 10 g sample of the ground kernels was mixed with 30 mL methanol–water (3:1, v/v). After standing for 10 min at room temperature, the suspension was shaken at 150 r.p.m for 1 hour at 10 °C. After filtration, the extract (1.0 mL) was applied to a preconditioned Sep-Pak plus QMA (Waters Co., Ltd). After washing the cartridge with 6 mL methanol–water (3:1) followed by 3 mL methanol (J.T. Baker, USA), fumonisins were eluted with 10 mL methanol containing 0.5 % acetic acid. The eluate was evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 40 °C, the residue was dissolved in 800 µL methanol–water (3:1) and a 200 µL aliquot dried under nitrogen. After derivatization with 200 µL O-phthaldialdehyde (OPA, Sigma Co., USA) reagent (40 mg OPA, 1 mL methanol, 5 mL 0.1M sodium borate and 50 µL 2-mercaptoethanol), high-performance liquid chromatography (HPLC) injections were made within 1 min. Fumonisin were analysed by a reversed-phase isocratic HPLC system (Shimadzu LC-10 AD pump and RF-10A XL fluorescence detector), using a Luna 5 µ column C₁₈ (4.6 x 250 mm; Phenomenex®). Excitation and emission wavelengths were 335 and 450 nm, respectively. The eluent was CH₃OH–0.1M NaH₂PO₄ (J.T. Baker, USA) (80:20, v/v) adjusted to pH 3.3 with o-phosphoric acid (J.T. Baker, USA) at 1 mL min⁻¹ flow rate. The detection limits for FB₁ and FB₂ were 27.5 and 35.3 ng g⁻¹, respectively. The recoveries of FB₁ and FB₂ from spiked corn in the range 100–400 ng g⁻¹ FB₁ and 250–450 ng g⁻¹ FB₂ averaged 106.3 % (mean CV=8 %) and 96.9 % (mean CV=10 %), respectively, based on duplicate spiking and triplicate analyses.

Protein and lipid determination

Nitrogen content was determined by the Kjeldahl method (A.O.A.C., 1985), using 6.25 as the factor to obtain the total protein content. Lipid content was determined by the Soxhlet method (I.A.L., 1985).

Statistical analysis

The *F. verticillioides* count, fumonisin levels and lipid/protein content were analysed statistically evaluated using ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test ($p < 0.05$). CFU g^{-1} data were transformed prior to analysis by $y = \log(CFU\ g^{-1})$. The Pearson correlation were analysed by the test-t. Statistical analysis were performed by the "Statistica" software version 6.0.

Results and Discussion

Figure 1 shows fumonisins production, log *F. verticillioides* counts and lipids and proteins levels under different treatments during the 20 days of incubation. In Figure 1 (a, b) the effect of the fungal culture period on fumonisins production can be observed. The toxin production increased with the course of the culture time. The highest production (FB₁ e FB₂) in the end of the period was obtained in treatments 927 (27 % moisture content, 27 ° C and 10⁴ propagules mL⁻¹), 252 (27%, 18 °C and 10⁴) and 391 (27 %, 18 °C and 10⁶), which reached average levels of total fumonisin (FB₁ + FB₂) of 328.04, 188.26 and 132.01 $\mu g\ g^{-1}$, respectively. Intermediate levels of production were observed in treatment 548 (22.5 %, 22.5 °C and 10³), 824 (22.5 %, 22.5 °C and 10⁵) and 763 (22.5 %, 22.5 °C and 10⁷), which reached average levels of total fumonisin (FB₁ + FB₂) of 73.38, 67.97 and 55.60 $\mu g\ g^{-1}$, respectively. The lowest levels were related to treatment 144 (18 %, 27 °C and 10⁴) and 095 (15 %, 22.5 °C and 10⁵), which were on average 0.62 and 1.14 $\mu g\ g^{-1}$, respectively.

Although fumonisins production (FB₁ e FB₂) have been higher in corn grains inoculated with 10⁴ propagules mL⁻¹ *F. verticillioides*, subject to adjustment from 27 % moisture and incubated at 27 °C (treatment 927), the data of Table 2 show that, considering the overall average of fumonisins, this treatment only differed significantly from the 095 and 144 treatments (15 and 18 % moisture content, 22.5 and 27 °C incubation temperature and 10⁵ and 10⁴ propagules mL⁻¹ of *F. verticillioides*, respectively). Similar fact was observed with respect to *F. verticillioides* count, where treatments 144 and 095 did not offer favorable

conditions for the growth, differing at 5 % level of significance of other treatments (Table 2, Figure 1a, b, e).

Concerning the kinetic data, when corn grains were submitted to 144 and 095 treatments, there was no increase in the levels of toxin during the 20 days of incubation (Figure 1 a,b). Moreover, increase of *F. verticillioides* count was observed only of the first 4 days of incubation in relation to subsequent, i.e., from the 6th day of incubation there was not increase of fungal growth. Pardo *et al.* (2004) studied the effects of water activity and temperature on germination and growth of three *Aspergillus ochraceus* isolates on barley extract agar medium and observed that when no germination or no growth occurred, the lag phase lasted along whole experiment.

Considering the treatments that had fumonisins intermediate production (548, 824 and 763), Table 1 shows similar moisture content and temperatures in these treatments, varying only the concentration of *F. verticillioides* spores (10^3 , 10^5 and 10^7 propagules mL⁻¹, respectively). However, the average fumonisin production of these three treatments (Table 2) shows that the highest spore concentration was not related to increased of toxin production. Similarly, in experiments with *A. parasiticus* (SHARMA *et al.*, 1980) and *A. flavus* (ODAMTTEN; APPIAH; LANGERAK, 1987), the lowest aflatoxin production was observed with the highest spore numbers inoculated. The toxin production is apparently suppressed when the number of spores inoculated per unit of substrate exceeds a certain level (KARUNARATNE; BULLERMAN, 1990).

The kinetic data for *F. verticillioides* count related to treatments 927, 252, 391, 548, 824 and 763 showed that the first two days corresponded to fungal adaptation phase in the substrate. This phase is usually observed when fresh medium is inoculated with cells derived from an old culture. Even if all microorganisms are viable, the cells might be deprived of enzymes so that the total growth rate can only be reached when the optimum concentrations of these substances for synthesis are restored. This fact can be observed in the present experiment when analyzing Figure 1e. Similarly, Granjo *et al.* (2007), analyzing the growth kinetics and morphogenesis of toxigenic *F. verticillioides* strains in culture medium, observed that the logarithmic growth phase started on 2nd incubation day. Pardo *et al.* (2004) observed that there was a parallelism between the increment of lag phases and the reduction of germination rates, i.e., favorable conditions reflected in higher growth and germination rate and shorter lag phase.

With respect to the logarithmic growth phase, the strain had growth during all incubation time, but this was more pronounced after the 10th day of incubation (Figure 1e).

Leontopoulos; Siafaka and Markaki (2003), using YES medium for analyzing *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B₁ (AFB₁) production during 15 days of incubation, observed that the highest mycelium occurred at 6th day of incubation. Granjo *et al.* (2007) observed that *F. verticillioides* strains had maximum growth between day 40 and day 44 of incubation.

According to fumonisin production, Figure 1 (a, b) shows increased production after the 10th day of incubation, except for treatments 095 and 144. Similarly, Leontopoulos; Siafaka and Markaki (2003) observed that the production of AFB₁ was measurable after the 3rd day of incubation until the 12th day, being that after this period, the levels of AFB₁ were increased dramatically. Dilkin *et al.* (2002) evaluated *F. verticillioides* strains in laboratory cultures subjected to different temperatures and moisture contents on corn substrate and the authors found that the fungal culture period had great importance for production of FB₁ and FB₂. Moreover, related that in 10th day of incubation time, the production was lower, but with the increase of culture periods, the mean production of fumonisins raised continually. In fungal metabolism, during and especially at the end of the growth, certain metabolites are synthesized which are not necessary for the growth and energy supply of the mould, like mycotoxins (SAMSON; HOESKSTRA; FRISVAD, 2004).

The correlation data between the independent variables (Table 3) show that there has been significant and positive correlation between *F. verticillioides* count and FB₁ and FB₂ production, i.e., conditions that favor fungal growth, can also create favorable conditions for mycotoxin production. Miller (2001) also emphasizes that production of fungal secondary metabolites was related with the favorable condition of fungal growth. Under such condition, with higher cell number, the total amount of metabolites reached could also be enhanced. Figure 1e confirms research that established the optimum temperature for *F. verticillioides* growth between 22.5 and 27.5 °C (PITT; HOCKING, 1997) and moisture of corn from 18.4 to 23 % (BACON; NELSON, 1994).

In all treatments a reduction in the lipids and proteins levels was observed in early incubation (Figure 1c, d) compared to initial time, i.e., before the fungal inoculation, which were 5.01 and 9.39 % respectively. The average lipid content reduction amounted to 81.6 %, which was found in the treatment 763 (22.5 % moisture, 22.5 °C and 10⁷ propagules mL⁻¹), and in treatment 252 (27 % moisture, 18 °C and 10⁴ propagules mL⁻¹) there was the highest reduction (50.3 %) in the protein content. Conventionally, carbohydrates is the main carbon source, but proteins and lipids probably may also feed pathogens (BROCK, 2009). Thus, the initial reduction of these two macro-nutrients may be associated with increased of primary

metabolism of fungal strain, which requires macro-and micronutrients for its growth. The importance of lipid metabolism has been described for several plant pathogenic fungi. *Magnaporthe grisea*, *Colleotrichium lagenarium* and *Leptosphaeria maculans* depend on a functional isocitrate lyase (Icl), a key enzyme from the glyoxylate cycle, for full virulence (ASAKURA; OKUNO; TAKANO, 2006; IDNURM; HOWLETT, 2002; WANG *et al.*, 2003). The virulence of *M. grisea* can be reduced by isocitrate lyase inhibitors (SHIN *et al.*, 2007). Nevertheless, deletion of Icl reduced growth in plants, suggesting that fatty acids constitute major nutrients during pathogenesis (BROCK, 2009). Moreover, the utilization of lipids as the sole or main carbon source presupposes a requirement of the glyoxylate cycle to provide hexose residues for nucleotide, cell wall, and amino acid biosynthesis (ASAKURA; OKUNO; TAKANO, 2006).

The protein content had correlation only with *F. verticillioides* count, which was negative (Table 3), i.e., in general, the higher fungal growth had the lower the protein levels. Concerning lipid levels, there were fluctuations in the concentrations along the incubation, and levels decreased at the beginning of fungal growth, followed by an increase in subsequent days and during the 20th day of incubation (Figure 1c).

The infection of corn by *F. verticillioides* can cause highly variable results ranging from systemic asymptomatic infections to severe rotting and wilting. Different studies suggested several possible factors that influenced the relationship between this fungus and corn, including amount of fungal inoculum in soil and kernels, the nutritional state of the plant, the plant and fungal genotypes and the environmental conditions (CANTALEJO; CARRASCO; HERNÁNDEZ, 1998; MILLER, 2001; FANDOHAN *et al.*, 2003). Later studies indicated that *F. verticillioides* can remain as an endophyte of corn based on its ability to detoxify antimicrobial compounds synthesized by plant and/or to produce phytohormone analogues (GLENN *et al.*, 2003; MALONEK *et al.*, 2004). More recently, data show that corn oxylipins constitute a key factor related to fungal mycotoxin biosynthesis and sporogenesis (GAO *et al.*, 2007). Most of the known hosts for mycotoxigenic fungi are oil-rich crops such as corn, peanut, cotton, and various tree nuts (DIENER *et al.*, 1987), pointing to an important role that plant lipids may have in the host-pathogen interactions.

The decrease in lipid levels in the beginning of the incubation and beginning of fungal growth may be explained by the production of oxylipins in the grains and/or by *F. verticillioides*. Oxylipins are a large class of diverse oxygenated polyenoic fatty acids (oleic, linoleic, and linolenic acid-derived oxylipins) and are produced via the lipoxygenase pathway. In plants, they have the function of signals in development and defense response to pathogen attack.

In fungi, oxylipins are potent regulators of sporogenesis, are required signals for biosynthesis of mycotoxins (BRODHAGEN; KELLER, 2006; BRODOWSKY; OLIW, 1993; HAMBERG *et al.*, 1994; SU; SAHLIN; OLIW, 1998) and are involved in signal communication with host cells (HERMAN 1998; KOCK *et al.*, 2003; NOVERR; ERB-DOWNWARD; HUFFNAGLE, 2003). In agreement with this idea, Wilson; Gardner and Keller (2001) observed the expression of a gene to incorporation of molecular oxygen into linoleic acid in corn by *F. verticillioides* and *Aspergillus flavus*. The authors obtained high levels of mycotoxins produced by these genera, suggesting that lipoxygenase products are utilized by mycotoxigenic fungi to induce biosynthesis of mycotoxins and, hence, that this gene is susceptibility factor in corn plants.

The increase of the levels of lipids in the days following of adaptation and log phases may correspond to lipid membranes of fungal cells. Moreover, lipids are produced by fungi during their metabolism, and are related largely to triglycerides and fatty acids. In filamentous fungi occur rates 6-9 % of its dry weight of lipids, according to Brennan and Losel (1978).

Data in Table 3 show positive and significant correlation between lipid levels and FB₁ and FB₂ production, i.e., the increase in the mycotoxin production had tendency for increase of lipids levels. This behavior is best described during the stationary phase, when there were increased of fumonisin levels, and can be explained by the probability of fumonisin synthesis be similar to the metabolic pathway of sphingosine, which forms a primary part of sphingolipids, a class of cell membrane lipids (BRANHAM; PLATTNER, 1993; BLACKWELL; MILLER; SAVARD, 1994; PLATTNER; BRANHAM, 1994).

Conclusion

Whichever the mode that allows *F. verticillioides* to interact with corn in asymptomatic and symptomatic infections, fumonisin occurrence constitutes a latent and imminent risk whenever the pathogen is present in the maize agroecosystem.

Standard grain storage procedures should prevent the development of fumonisins in stored grain. Generally, fumonisin concentrations are not believed to increase during storage as long as proper conditions of grain moisture and temperature are maintained. Subsequent stable storage conditions which prevent initiation and growth of spoilage species are necessary for effective long term grain quality conservation.

Acknowledgements

The authors thank the Brazilian Government Organization for grant aid and fellowship to Brazilian researchers (CNPq) in association with Ministry of Agriculture (MAPA), Livestock and Food Supply, the Araucária Foundation (Paraná State grant), Paraná Fund/SETI and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) – Nanobiotechnology Network Program (04/CII-2008) for financial support. The CNPq/Pq Scholarship is greatly appreciated by E.Y.S.Ono and E.Y.Hirooka.

Referências

ALBERTS, J. F.; GELDERBLUM, 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 B₁ by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1729–1733, 1990.

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

ANDREWS, S.; PITT, J. I. Selective medium for *Fusarium* species and dermatiaceus hyphomycetes from cereals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, p. 1235-1238, 1986.

ASAKURA, M.; OKUNO, T.; TAKANO, Y. Multiple contributions of peroxisomal metabolic function to fungal pathogenicity in *Colletotrichum lagenarium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 6345-6354, 2006.

ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 16. ed. AOAC, cap. 49, p. 35-36, 1995.

AZIZ, N.H.; MATTER, Z.A.; SHAHIN, A. A. M. Detection of fumonisin B₁ produced by *Fusarium moniliforme* and its control by gamma radiation and food preservatives. **Egyptian Journal of Microbiology**, v. 10, p. 96–107, 2005.

AZIZ, N. H.; EL-FAR, F. M.; SHAHIN, A. A. M.; ROUSHY, S. M. Control of *Fusarium* moulds and fumonisin B₁ in seeds by gamma-irradiation. **Food Control**, v. 18, p. 1337–1342, 2007.

BLACKWELL, B. A.; MILLER, J. D.; SAVARD, M. E. Production of carbon 14-labeled fumonisin in liquid culture. **Journal of AOAC International**, v.77, p.506- 511, 1994.

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.

BACON, C. W.; TATES, I. E.; HINTON, D. M.; MEREDITH, F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 325–332, 2001.

- BERND, L. P.; CURIONI, A. A.; BASSO, F.; FURLONG, E. B.; ONO, E. Y. S.; GERAGE, A. C.; HIROOKA, E. Y. Modelagem matemática para fumonisinas em milho e perfil cromatográfico de metabólitos produzidos por *Fusarium verticillioides*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, p. 361-378, 2008.
- BRANHAM, B. E.; PLATTNER, R. D. Alanine is a precursor in the biosynthesis of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**, v.124, p.99-104, 1993.
- BRENNAN, P. J.; LOSEL, D. M. Physiology of fungal lipids: selected topics. **Advances in Microbial Physiology**, n. 17, p. 47-179, 1978.
- BROCK, M. Fungal metabolism in host niches. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, p. 371-376, 2009.
- BRODHAGEN, M.; KELLER, N. P. Signalling pathways connecting mycotoxin production and sporulation. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, p. 285-301, 2006.
- BRODOWSKY, I. D.; OLIW, E. H. Biosynthesis of 8r-hydroperoxylinoleic acid by the fungus *Laetisaria arvalis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1168, p. 68-72, 1993.
- CAHAGNIER, B.; MELCION, D.; RICHARD-MOLARD, D. Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B₁ on maize grain as a function of different water activities. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 247-251, 1995.
- CANTALEJO, M. J.; CARRASCO, J. M.; HERNÁNDEZ, E. Incidence and distribution of *Fusarium* species associated with feeds and seeds from Spain. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 15, p. 36-39, 1998.
- Council for Agricultural Science and Technology - CAST. **Mycotoxins: economics and health risks**. Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Technology, 2003; Task Force Report 139. Force Report No. 116.
- DIENER, U. L.; COLE, R. J.; SANDERS, T. H.; PAYNE, G. A.; LEE, L. S.; KLICH, M. A. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. Annu. **Annual Review of Phytopathology**, v. 25, p. 249-270, 1987.
- DILKIN, P.; MALLMANN, C. A.; DE 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.
- DOOHAN, F. M.; BRENNAN, J.; COOKE, B. M. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p. 755-768, 2003.
- FANDOHAN, P.; HELL, K.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, M. J. Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in Africa. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 570-579, 2003.
- FERREIRA-CASTRO, F. L.; AQUINO, S.; GREINER, R.; RIBEIRO, D. H. B.; REIS, T. A.; CORRÊA, B. Effects of gamma radiation on maize samples contaminated with *Fusarium verticillioides*. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 65, p. 927-933, 2007.
- FISHER, N. L.; BURGESS, L. W.; TOUSSOUN, T. A.; NELSON, P. E. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology*, v. 72, p. 151-153, 1982.
- GAO, X.; SHIM, W.; GÖBEL, C.; KUNZE, S.; FEUSSNER, I.; MEELEY, R.; BALINT-KURTI, P.; KOLOMIETS, M. Disruption of a maize 9-lipoxygenase results in increased

resistance to fungal pathogens and reduced levels of contamination with mycotoxin fumonisin. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 20, p. 922–933, 2007.

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.

GELINEAU-VAN WAES, J.; VOSS, K. A.; STEVENS, V. L.; SPEER, M. C.; RILEY, R. T. Maternal fumonisin exposure as a risk factor for neural tube defects. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 56, p. 145-181, 2009.

GLENN, A. E.; MEREDITH, F. I.; MORRISON, W. H.; BACON, C. W. Identification of intermediate and branch metabolites resulting from biotransformation of 2- benzoxazolinone by *Fusarium verticillioides*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 3165–3169, 2003.

GONZALEZ, H. H.; RESNIK, S. L.; PACIN, A. M. Mycoflora of freshly harvested flint corn from Northwestern Provinces in Argentina. **Mycopathologia**, v. 155, p. 207-211, 2000.

GRANJO, C. A.; DOS REIS, T. A.; GAMBALE, W.; CORRÊA, B. Morphogenesis and growth kinetics of *Fusarium verticillioides*. **Mycopathologia**, v. 164, p. 119–126, 2007.

HAMBERG, M.; ZHANG, L. Y.; BRODOWSKY, I. D.; OLIW, E. H. Sequential oxygenation of linoleic acid in the fungus *Gaeumannomyces graminis*—stereochemistry of dioxygenase and hydroperoxide isomerase reactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 309, p. 77-80, 1994.

HERMAN, R. Oxylipin production and action in fungi and related organisms. p.115-130. In: **Eicosanoids and related compounds in plants and animals**. Rowley, A. F.; Kuhn, H.; Schewe, T. eds. Princeton University Press, Princeton, NJ, U.S.A. 1998.

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

IDNURM, A.; HOWLETT, B. J. Isocitrate lyase is essential for pathogenicity of the fungus *Leptosphaeria maculans* to canola (*Brassica napus*). **Eukaryotic Cell**, v., 1, p. 719-724, 2002.

JEFFRIES, C. J.; BOYD, A. E. W.; PATERSON, L. J. Evaluation of selective media for the isolation of *Fusarium solani* var. *coeruleum* and *Fusarium-sulphureum* from soil and potato-tuber tissue. **Annals of Applied Biology**, v. 105, p. 471-481, 1984.

KARUNARATNE, A.; BULLERMAN, L. B. Interactive effects of spore load and temperature on aflatoxin production. **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 227–229, 1990.

KOCK, J. L. F.; STRAUSS, C. J.; POHL, C. H.; NIGAM, S. The distribution of 3-hydroxy oxylipins in fungi. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 71, p. 85-96, 2003.

LE BARS, J.; LE BARS, P.; DUPUY, J.; BOUDRA, H. Biotic and abiotic factors in fumonisin B₁ production and stability. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v. 77, p. 517-521, 1994.

LEDOUX, D. R.; BROWN, T. P.; WEIBKING, T. S.; ROTTINGAUS, G.E. Fumonisin toxicity in broiler chicks. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, p. 330–333, 1992.

LEONTOPOULOS, D.; SIAFAKA, A.; MARKAKI, P. Black olives as substrate for *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B₁ production. **Food Microbiology**, v. 20, p. 119–126, 2003.

- LINO, C. M.; SILVA, L. J.; PENA, A. S. Fumonisin: Presença em Alimentos, Implicações na Saúde e Aspectos Legislativos. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinária**, v. 90, p. 181-192, 2004.
- MALONEK, S.; ROJAS, M.C.; HEDDEN, P.; GASKIN, P.; TUDZYNSKI, B. The NADPH: cytochrome P450 reductase gene from *Gibberella fujikuroi* is essential for gibberellin biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 25075–25084, 2004.
- MILLER, J. D. Factors That Affect the Occurrence of Fumonisin. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 321-324, 2001.
- NASH, S. M.; SNYDER, W. C. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. **Phytopathology**, v. 52, p. 567-72, 1962.
- 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, 1983.
- NOVERR, M. C.; ERB-DOWNWARD, J. R.; HUFFNAGLE, G. B. Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 517-533, 2003.
- ODAMTTEN, G.T.; APPIAH, V.; LANGERAK, D.I. Influence of inoculum size of *Aspergillus flavus* link on the production of aflatoxin B₁ in maize medium before and after exposure to combination treatment of heat and gamma radiation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 4, p. 119–127, 1987.
- 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**. 19th ASIC Coffee Conference, Trieste, Italy, 14-18 May, 2001.
- PARDO, E.; MARÍN, S.; SOLSONA, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Modeling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* as affected by water activity and temperature on a barley-based medium. **Food Microbiology**, v. 21, p. 267-274, 2004.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Aspergillus* and related teleomorphs. In: Pitt, J. I.; Hocking, A. D., editors. **Fungi and Food**. Fumonisin in Food Spoilage, Academic Press, London; pp. 339–416, 1997.
- 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.; BRANHAM, B. E. Labeled fumonisins: production and use of fumonisin B₁ containing stable isotopes. **Journal of AOAC International**, v.77, p.525-532, 1994.
- SAMSON, R.A.; HOESKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C. **Introduction to food-borne fungi**. 4 ed. The Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995.
- SAMSON, R.A., HOESKSTRA, E.S., FRISVAD, J.C. **Introduction to food and airborne fungi**. 7 ed. The Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2004.
- SHARMA, A.; BEHERE, A.G.; PADWAL DESAI, S.R.; NADKARNI, G.B. Influence of inoculum size of *Aspergillus parasiticus* spores on aflatoxin production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 40, p. 989-993, 1980.

- SHEPHARD, G. S.; SYDENHAM, E. W.; THIEL, P. G.; GELDERBLUM, W. C. A. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, p. 2077-2087, 1990.
- SHIN, D.S.; LEE, T. H.; LEE, H. S.; SHIN, J.; OH, K. B. Inhibition of infection of the rice blast fungus by halisulfate 1, an isocitrate lyase inhibitor. **FEMS Microbiology Letters**, v. 272, p. 43-47, 2007.
- SU, C.; SAHLIN, M.; OLIW, E. H. A protein radical and ferryl intermediates are generated by linoleate diol synthase, a ferric hemeprotein with dioxygenase and hydroperoxide isomerase activities. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 20744-20751, 1998.
- SYDENHAM, E. W.; THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O.; SHEPHARD, G. S.; SCHALKWYK, D. J.; KOCK, K. R. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 767-771, 1990.
- Sydenhan, E. W.; Marasas, W. F. O.; Shephard, 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, 1992.
- THIEL, P. G.; MARASAS, W. O. F.; SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. S.; GELDERBLUM W. C. A.; NIEUWENHUIS, J. J. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1089-1093, 1991.
- 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.
- UENO Y. Risk of multi-exposure to natural toxins. **Mycotoxins**, v. 50, p. 13-22, 2000.
- WANG, Z. Y.; THORNTON, C. R.; KERSHAW, M. J.; DEBAO, L.; TALBOT, N. J. The glyoxylate cycle is required for temporal regulation of virulence by the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Microbiology**, v. 47, p. 1601-1612, 2003.
- WILSON, R. A.; GARDNER, H. W.; KELLER, N. P. Cultivar-dependent expression of a maize lipoxygenase responsive to seed infesting fungi. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, p. 980-987, 2001.
- ZHANG, H.; NAGASHIMA, H.; GOTO, T. Natural occurrence of mycotoxins in corn samples from high and low risk areas for human esophageal cancer in China. **Mycotoxins**, v. 44, p. 29-35, 1997.

Table 1 - Adjusted moisture to corn grains, incubation temperature and *F. verticillioides* inoculum to each treatment

Treatment codification	Moisture content (%)	Temperature (°C)	Concentration of <i>F. verticillioides</i> inoculum (propagules mL ⁻¹)
095	15	22.5	10 ⁵
144	18	27	10 ⁴
763	22.5	22.5	10 ⁷
824	22.5	22.5	10 ⁵
548	22.5	22.5	10 ³
391	27	18	10 ⁶
252	27	18	10 ⁴
927	27	27	10 ⁴

Table 2 - Fumonisin production, log *F. verticillioides* count, lipids and protein levels under different treatments

Treatment*	FB ₁ (µg g ⁻¹)	FB ₂ (µg g ⁻¹)	<i>F. verticillioides</i> (log CFU g ⁻¹)	Lipids (%)	Protein (%)
(095) U=15%, T=22,5°C, I=10 ⁵	0.84 ^b	0.48 ^b	3.27 ^b	2.07 ^{b,c}	8.77 ^a
(144) U=18%, T=27°C, I=10 ⁴	0.59 ^b	0.34 ^b	3.19 ^b	1.39 ^{b,c}	8.37 ^a
(763) U=22,5%, T=22,5°C, I=10 ⁷	13.00 ^{a,b}	6.78 ^{a,b}	6.31 ^a	0.92 ^c	8.14 ^a
(824) U=22,5%, T=22,5°C, I=10 ⁵	13.43 ^{a,b}	7.34 ^{a,b}	5.88 ^a	1.04 ^c	8.25 ^a
(548) U=22,5%, T=22,5°C, I=10 ³	10.72 ^{a,b}	5.39 ^{a,b}	5.59 ^a	0.93 ^c	8.28 ^a
(391) U=27%, T=18°C, I=10 ⁶	14.23 ^{a,b}	11.22 ^{a,b}	5.82 ^a	2.00 ^{b,c}	7.62 ^a
(252) U=27%, T=18°C, I=10 ⁴	21.48 ^{a,b}	13.74 ^{a,b}	5.41 ^a	4.79 ^a	4.66 ^b
(927) U=27%, T=27°C, I=10 ⁴	31.87 ^a	23.05 ^a	6.73 ^a	2.35 ^b	7.66 ^a

*(095; 144; 763; 824; 548; 391; 252; 927) = treatment codification; U= moisture content (%); T= Temperature (°C); I= log *F. verticillioides* inoculum (propagules mL⁻¹)

**Means within a column followed by the same letter are not significantly different according to Tukey test (p>0.05).

Table 3 - Correlation between fumonisin, *F. verticillioides* count, lipids and protein levels

Variables	FB ₁ (μg g ⁻¹)	FB ₂ (μg g ⁻¹)	<i>F. verticillioides</i> count (log CFU g ⁻¹)	Lipids (%)	Proteins (%)
FB ₁ (μg g ⁻¹)	ρ = 1.000 p = ---	ρ = 0.988** p = 0.000	ρ = 0.474** p = 0.000	ρ = 0.198** p = 0.012	ρ = -0.101 p = 0.201
FB ₂ (μg g ⁻¹)		ρ = 1.000 p = ---	ρ = 0.438** p = 0.000	ρ = 0.232** p = 0.003	ρ = -0.068 p = 0.387
<i>F. verticillioides</i> count (log CFU g ⁻¹)			ρ = 1.000 p = ---	ρ = 0.094 p = 0.236	ρ = -0.178** p = 0.024
Lipids (%)				ρ = 1.000 p = ---	ρ = -0.035 p = 0.653
Proteins (%)					ρ = 1.000 p = ---

**Significant correlations (p < 0.05), ρ = correlations, p = level of significance.

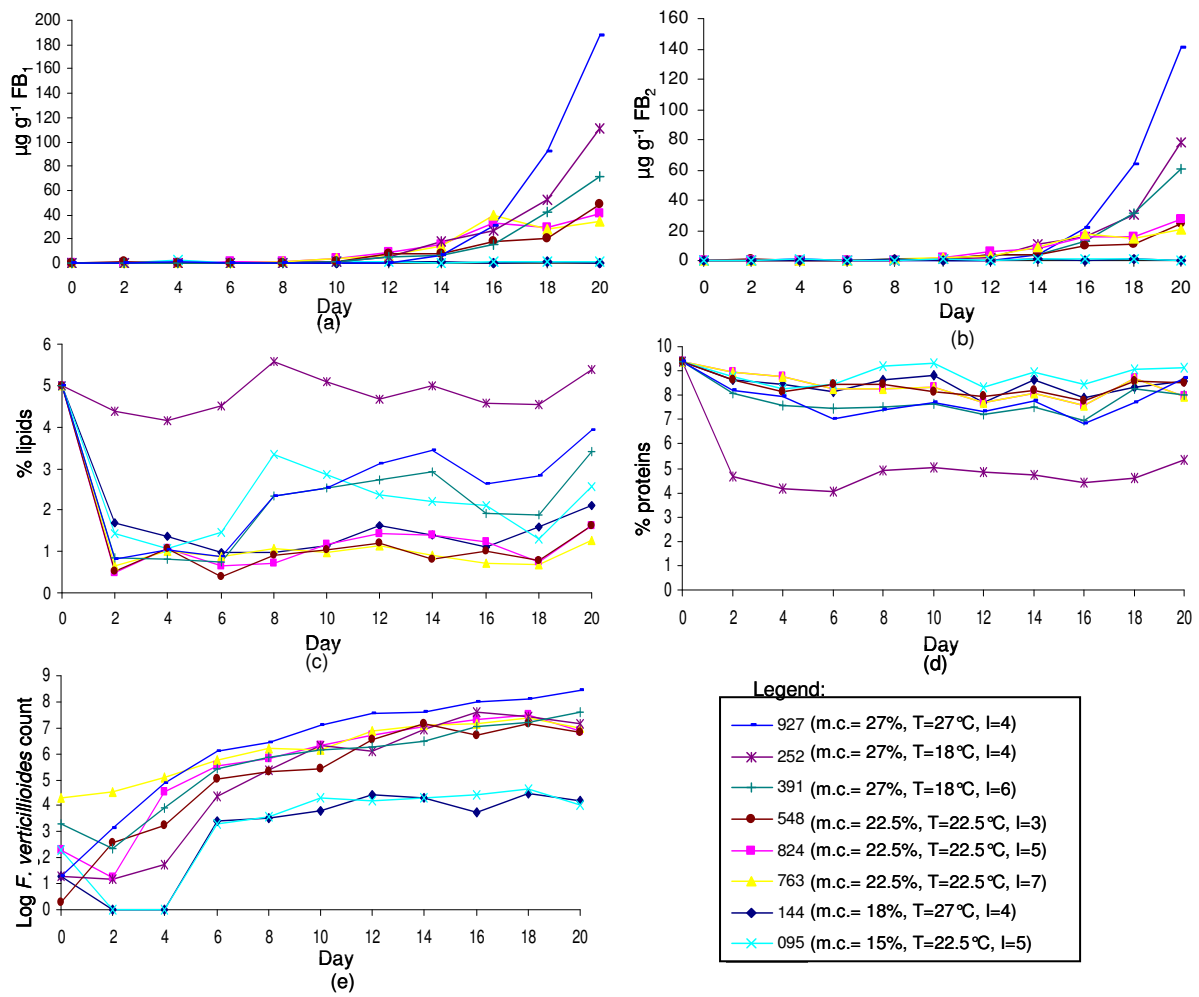


Figure 1. Kinetic of fumonisin production FB₁ (a), FB₂ (b); lipids level (c); protein levels (d) and log *F. verticillioides* count (e) under different treatments.

*m.c.= moisture content (%); T= Temperature (°C); I= log *F. verticillioides* (propagules mL⁻¹)

**0 day = Fumonisin, lipids and proteins levels of corn at the time of inoculation with *F. verticillioides*. To log *F. verticillioides* count, is the amount of inoculum in each treatment.

5.6 Efeito da Densidade de plantas e doses de nitrogênio na cultura do milho na contaminação por fumonisinas e nas características físico-químicas dos grãos

RESUMO

Embora, em função da competição de mercado, exista a crescente necessidade de se alcançar elevada produtividade na cultura do milho, é preciso aliá-la à manutenção da qualidade desta matéria-prima. *Fusarium verticillioides* encontra-se freqüentemente associado a esta gramínea e é produtor de fumonisinas, metabólitos secundários que representam riscos à saúde humana e de animais. Desta maneira, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de populações de plantas e doses de adubação nitrogenada em cobertura na contaminação por fumonisinas e características físico-químicas de grãos de milho do híbrido AG 9010 YG em sistema de semeadura direta na segunda safra de 2009. O delineamento experimental, em blocos casualizados com quatro repetições, seguiu o planejamento fatorial 4x4, onde se avaliou quatro populações de plantas (40, 60, 80 e 100 mil plantas por hectare) e quatro doses de nitrogênio em cobertura (0, 50, 100 e 150 Kg ha⁻¹). A contaminação por fumonisinas não teve correlação significativa ($p > 0,05$) com a dose de nitrogênio em cobertura e com a densidade de plantas. Observou-se maiores teores de proteínas e lipídeos e menores níveis de amido nos grãos com o aumento das doses de nitrogênio. A densidade populacional teve correlação significativa negativa com os teores de cinzas e lipídeos, e maiores teores de amido foram detectados com incremento da população de plantas.

Palavras-chave: Densidade de plantas, adubação, micotoxina, *Zea mays*.

ABSTRACT

Although the producers need high productivity of corn, it is necessary to maintain this raw material quality. *Fusarium verticillioides* is frequently associated with corn and produces fumonisins, secondary metabolites that cause diseases in animals and humans. This study aimed to evaluate the effect of plant populations and nitrogen fertilization in fumonisin contamination and chemical/physical characteristics of corn hybrid AG 9010 YG (2009 crop). The experimental design was randomized blocks with four replications, followed the 4x4 factorial design, which evaluated four plant populations (40, 60, 80 and 100 thousand plants ha⁻¹) and four nitrogen rates (0, 50, 100 and 150 kg ha⁻¹). Fumonisin production had no significant correlation ($p > 0.05$) with nitrogen level and plant density. Higher lipids and proteins and lower starch levels in grains occurred with increasing nitrogen fertilization levels. Population density had significant negative correlation with minerals and lipids, and higher starch content occurred with increasing plant population.

Keywords: Plant densities, fertilization, mycotoxin, *Zea mays*.

Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais cultivados no mundo, sendo sua importância atribuída à sua multiplicidade de aplicações, tanto na alimentação humana quanto na animal, assumindo, ainda, relevante papel socioeconômico (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000). Segundo a CONAB (2010), a produção brasileira total de grãos 2009/2010 é estimada em 143,95 milhões de toneladas, sendo que a produção de milho deve alcançar cerca

de 51, 3 milhões de toneladas. No cenário nacional, o Estado do Paraná ocupa posição estratégica pela maior produção de grãos, tendo destaque o milho, com uma estimativa de produção de 11,5 milhões de toneladas para a safra 2009/2010.

Alguns fatores inerentes à produção afetam a qualidade do milho, a exemplo da própria cultivar, solo, fertilização, clima, práticas culturais, pragas e contaminação por microrganismos e micotoxinas (LAZZARI; LAZZARI, 2000).

Entre os fungos micotoxigênicos da cadeia produtiva de milho, *Fusarium verticillioides* destaca-se na pós-colheita, nas imediações da fase de pré-secagem, pela produção de fumonisina, um metabólito secundário promotor de câncer e responsável pelo desencadeamento de intoxicação aguda em animais (BEZUIDENHOUT et al., 1988; NELSON; DESJARDINS; PLATTNER, 1993). A produção de fumonisinas é influenciada por diferentes fatores, incluindo disponibilidade de nutrientes para as plantas e os aspectos ambientais como precipitação pluviométrica e temperatura durante toda cadeia produtiva da cultura (SWEENEY; DOBSON, 1998). Regiões tropicais e subtropicais são as mais favoráveis para o desenvolvimento fúngico em cereais e, conseqüentemente, para a produção destas toxinas (CAHAGNIER; MELCION; RICHARD-MOLARD, 1995). Devido aos efeitos nocivos associados à presença de espécies de *Fusarium* spp. em culturas agrícolas, o controle de *F. verticillioides* e a conseqüente produção de fumonisinas em milho tem se tornado uma prioridade na investigação de segurança dos alimentos.

Com relação à fertilização do solo, uma das variáveis determinantes da produção de milho é o fornecimento de nutrientes para a cultura, dentre os quais se destaca o nitrogênio, uma vez que este participa da composição dos aminoácidos, proteínas, clorofila e enzimas essenciais que estimulam o crescimento e o desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular (BRADY, 1989). Por este motivo, este é o nutriente absorvido em maior quantidade pela cultura do milho, e também o mais limitante para o desenvolvimento e produtividade da mesma.

A deficiência de nitrogênio reduz a densidade de grãos entre 9 e 25 % e a produtividade de grãos, entre 14 e 80 %, porque esse elemento, além de afetar a determinação do número de células endospermáticas e de grânulos de amido, pode reduzir a fonte de fotoassimilados, devido à diminuição da área foliar (NHEMI et al., 2004). Além disso, plantas de milho expostas ao estresse por falta de fertilidade do solo também são altamente susceptíveis à infecção por microrganismos. Diversos autores relataram alta incidência de doenças causadas por fungos toxigênicos em milho devido ao *stress* por falta de fertilizante (SHELBY; WHITE; BAUSKE, 1994; RODRIGUEZ-DEL-BOSQUE, 1996; MILLER, 2001;

MUNKVOLD, 2003). Lisker; Lillehoj (1991) demonstraram que altos níveis de aflatoxinas podem estar relacionados a estresses por deficiência de nutrientes, em especial o nitrogênio.

A otimização da produtividade de grãos depende, entre outros fatores, da eficiência de canalização de carbono e nitrogênio para o grão e da transformação desses elementos em compostos de reserva (SODEK, 1989). A composição química quantitativa das sementes é definida geneticamente, apesar de poder ser, até certo ponto, influenciada pelas condições ambientais a que foram submetidas às plantas que as originaram. Desta forma, a disponibilidade de nutrientes no solo pode influenciar a composição química do grão de forma a melhorar a sua qualidade, favorecendo desde o vigor até o potencial de armazenamento de sementes.

Em se tratando de práticas culturais, diversos fatores de manejo influenciam no rendimento de grãos de milho. A escolha do adequado arranjo de plantas na cultura é um dos principais fatores de definição deste rendimento, devido a sua importância na eficiência da interceptação da radiação solar e distribuição do sistema radicular no solo (SANGOI, 2001).

Entre as formas de manipulação do arranjo espacial, a densidade de plantas é a que tem maior interferência na produtividade do milho, pois pequenas alterações na população podem afetar significativamente o rendimento de grãos.

Atualmente, a densidade alta e o espaçamento reduzido fazem parte do novo enfoque do arranjo de plantas na cultura do milho (SILVA *et al.*, 2006). Por meio do melhoramento genético, novos híbridos de milho com arquitetura modificada, folhas menores e mais eretas, têm permitido o aumento na densidade, resultando em maiores produtividades (SHIOGA; OLIVEIRA; GERAGE, 2004). No entanto, o incremento na população de plantas, principalmente sob espaçamento reduzido entre linhas, aumenta a incidência de doenças foliares, de colmo e de espiga na cultura do milho (CASA; REIS, 2003). Com densidades elevadas, há menor circulação de ar no interior do dossel, o que favorece um período mais prolongado de deposição de orvalho nas folhas, estimulando a germinação de esporos de fungos que ocasionam doenças foliares (SANGOI *et al.*, 2003). Altas populações impõem restrições à atividade fotossintética das folhas, sendo que a limitação imposta às folhas induz o colmo a redirecionar fotoassimilados em maior quantidade ao enchimento de grãos, fragilizando-o e facilitando a ocorrência de podridões (SANGOI *et al.*, 2000). Diversos patógenos responsáveis por podridões de colmo podem migrar para a espiga, favorecendo a ocorrência de grãos ardidos (RIBEIRO *et al.*, 2005).

Com a utilização de espaçamentos reduzidos entre linhas, ocorre uma melhor distribuição das plantas de milho na área, otimizando o aproveitamento dos recursos do meio,

contudo, concomitantemente os produtores tendem a aumentar a população de plantas gerando uma maior demanda por nutrientes. Assim, tanto a população de plantas quanto a dose de nitrogênio utilizada em cobertura podem afetar o desenvolvimento, a produtividade da lavoura, as características químicas e micológicas do grão e, conseqüentemente afetar a qualidade do produto.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de populações de plantas e doses de adubação nitrogenada em cobertura sobre a contaminação por fumonisinas e características físico-químicas de grãos de milho em sistema de semeadura direta sob espaçamento reduzido.

Material e Métodos

Matéria-prima

A matéria-prima utilizada foi grãos de milho do híbrido AG9010 YG, um híbrido transgênico com a tecnologia YIELDGARD® para controle de lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), lagarta da espiga (*Helicoverpa zea*) e Broca do colmo (*Diatraea saccharalis*).

Localização do experimento e caracterização do local

O experimento foi conduzido no período de segunda safra (safrinha) no ano de 2009 no Distrito da Prata, pertencente ao município de Cambé - PR, o qual se encontra a 23° 5' 50" latitude sul, 52° 24' 7" longitude oeste de Greenwich, com altitude de 430 m. O solo do local é caracterizado como Latossolo Vermelho distroférrico (LVdf). O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é Cfa, ou seja, clima subtropical, com temperatura média no mês mais frio inferior a 18 °C (mesotérmico) e temperatura média no mês mais quente acima de 22 °C, com verões quentes, geadas pouco freqüentes e tendência de concentração das chuvas nos meses de verão, contudo sem estação seca definida (IAPAR, 2010).

Delineamento experimental

Foi utilizado um delineamento experimental de parcelas sub-divididas em esquema fatorial 4 x 4 (quatro populações x quatro doses), com quatro repetições, totalizando 16 tratamentos. Na parcela principal, foram testadas quatro populações de plantas, equivalentes a 40, 60, 80 e 100 mil plantas ha⁻¹ em espaçamento reduzido entre linhas. Nas sub-parcelas, testaram-se quatro doses de N em cobertura (0, 50, 100 e 150 Kg ha⁻¹). A sub-parcela

experimental foi constituída por 8 linhas de 5 m de comprimento, com espaçamento entre linhas fixo de 0,45 m. A área útil de cada parcela experimental foram as quatro linhas centrais, totalizando 9 m².

Procedimento operacional

Previamente a instalação do experimento, foram coletadas amostras de solo da área experimental para análise química. Com base nestes resultados, o solo foi corrigido com calcário, visando à elevação da saturação de bases para 70 %. A adubação de nitrogênio, fósforo e potássio (N-P-K) na semeadura foi realizada conforme a análise do solo, seguindo as indicações técnicas da cultura (EMBRAPA, 2009). Para a adubação nitrogenada de cobertura foi utilizado como fonte de nitrogênio o SuperN[®], sendo realizada no estádio V4, correspondendo à quatro folhas expandidas.

Anteriormente à semeadura, as sementes foram tratadas com o fungicida Maxim[®] (Fludioxonil + Metalaxyl-m), na dose 1,5 mL kg⁻¹ de semente e com o inseticida Crop Star[®] (Thiodicarb), na dose de 350 mL para 60 mil sementes.

Realizou-se semeadura direta, com uma semeadora adubadora, dispondo-se duas sementes por cova. No estádio V2 a V3, foi feito desbaste, deixando-se apenas uma planta por cova e obtendo-se a população igual à pré-estabelecida nos tratamentos.

Após a colheita de oito espigas por tratamento, de maneira aleatória, estas foram higienizadas externamente com álcool 70° GL. Posteriormente, procedeu-se retirada da palha e debulhamento. Os grãos foram secos em estufa de circulação de ar a 50 °C por 24 horas, sendo em seguida armazenados a 4 °C até o momento da moagem. Os grãos moídos foram acondicionados em sacos plásticos a -18 °C até o momento das análises.

Determinação de fumonisinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A determinação de fumonisinas foi realizada por CLAE de acordo com a metodologia descrita por Shephard *et al.* (1990), modificada por Ueno *et al.* (1993). Para extração, um volume de 30 mL de metanol: água (3:1, v:v) foi adicionado a 10 g de amostra triturada (50 mesh), seguido de agitação a 150 r.p.m. por 1 hora a 10 °C (incubadora refrigerada Marconi[®]). Após filtração, foi aplicado 1 mL do extrato bruto em coluna de troca aniônica Sep-Pak accell plus QMA (Waters Co., Ltda, Irlanda) previamente acondicionada com 5 mL de metanol, seguido de 5 mL de metanol:água (3:1, v:v). Posteriormente, foram aplicados 6 mL de metanol:água (3:1, v:v), seguidos de 3 mL de metanol. As fumonisinas foram eluídas com 10 mL de solução ácido acético 0,5 % em metanol e o eluato seco a 40 °C. O resíduo foi

ressuspensão em 2 mL de metanol:água (3:1, v:v), seco sob gás N₂ a 40 °C e novamente ressuspensão em 800 µL de metanol:água (3:1, v:v). Alíquotas de 200 µL foram secas em gás N₂ a 40 °C. Uma alíquota de 200 µL foi ressuspensa em 100 µL de acetonitrila:água (1:1), derivatizada com 200 µL de o-phtaldialdeído (40 mg de OPA, 1 mL de metanol, 5 mL de borato de sódio 0,1 mol L⁻¹ e 50 µL de 2- mercaptoetanol) e as injeções foram feitas dentro de 1 min em CLAE. Fumonisinias foram analisadas em sistema isocrático de fase reversa por CLAE (bomba LC-10 AD e detector de fluorescência RF 10 AXL, Shimadzu, Japão), usando coluna C₁₈ Luna 5 µ (4,6 x 250 mm; Phenomenex[®], EUA). Foi utilizado comprimento de onda de 335 nm e 450 nm de excitação e emissão, respectivamente. A fase móvel consistiu de metanol: fosfato de sódio (CH₃OH:Na₂HPO₄) 0,1 M (80:20, v:v) ajustado com ácido o-fosfórico a pH 3,3, fluxo de 1 mL min⁻¹. O limite de detecção de FB₁ e FB₂ foi 27,5 e 35,3 ng g⁻¹, respectivamente.

Determinação de lipídeos, proteínas e cinzas

O teor de proteína bruta foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995), convertendo-se o teor total de N em proteína pelo uso do fator 6,25. O conteúdo de lipídeo foi determinado pelo método de Soxhlet mediante extração com éter de petróleo; e os teores de cinzas foram determinados mediante pesagem de resíduos de incineração (I.A.L., 1985).

Determinação de amido disponível

A extração de amido disponível foi realizada segundo AOAC (1995), modificado por Walter; Silva; Perdomo (2005).

Em 0,3 g de grãos triturados e peneirados foi adicionado 0,2 mL de etanol 80 %, 3,0 mL de tampão fosfato pH 6,8, e 0,1 mL da solução de α-amilase (Sigma[®]) termoestável:água (30:70, v/v). Após agitação, o material foi aquecido em banho-maria a 95 °C por 5 minutos, sendo em seguida resfriado até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 4,0 mL de tampão acetato de sódio, pH 4,5, e 0,1 mL da solução de amiloglicosidase (Sigma[®]):água (30:70, v/v), seguido de aquecimento em banho-maria a 50 °C por 30 minutos e resfriamento até a temperatura ambiente. O material teve seu volume ajustado para 100 mL em balão volumétrico com água destilada.

Após a extração e hidrólise do amido, foi utilizada a metodologia proposta por Nelson (1944) modificado por Somogy (1945) para a quantificação da glicose, sendo realizada a leitura em espectrofotômetro a 505 nm. Utilizou-se uma curva padrão de glicose 0,02 %,

fazendo-se diluições com concentrações de glicose de 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Análise Estatística

Os resultados obtidos em relação às doses de nitrogênio e densidade populacional foram estatisticamente avaliadas usando análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Comparação Múltipla de Tukey, a 95 % de confiança. A correlação de Pearson foi aplicada para as variáveis dependentes e independentes e analisada pelo teste-t. As análises estatísticas realizadas no programa “Statistica, versão 6.0”.

Resultados e Discussão

As fumonisinas foram detectadas em 95,3 % das amostras de milho analisadas, sendo que os níveis de fumonisinas totais ($\text{FB}_1 + \text{FB}_2$) variaram de 0,02 a 5,89 $\mu\text{g g}^{-1}$, estando assim, dentro do limite máximo de 5, 10, 50 e 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ recomendado para equínos, suínos, bovinos e aves, respectivamente, pelo “Mycotoxin Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians” (IARC-WHO, 2002). Em Santa Catarina, a safra 2000 apresentou níveis de FB_1 e FB_2 de 3,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 3,4 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente (WESTHUIZEN *et al.*, 2003). Moreno *et al.* (2009) analisaram a contaminação natural de 90 amostras de milho do Norte do Estado do Paraná da safra de 2004 e observaram níveis de fumonisinas de 0,07 a 18,16 $\mu\text{g g}^{-1}$ na etapa de recepção de uma indústria de processamento de grãos. No entanto, segundo os autores, a variabilidade do nível de contaminação de fumonisinas varia de acordo com a safra, uma vez que as diferenças nas precipitações pluviométricas entre elas são grandes.

Na Tabela 1 são apresentados os dados de correlação entre as variáveis independentes (dose de nitrogênio e densidade populacional) e as respostas obtidas nas diferentes características avaliadas (fumonisinas, amido, cinzas, lipídeos e proteínas dos grãos de milho). A contaminação por fumonisinas não apresentou correlação significativa ($p > 0,05$) com a dose de nitrogênio em cobertura e com a densidade populacional, sendo que perante as micotoxinas avaliadas, somente observou-se correlação positiva significativa ($p < 0,05$) entre elas (FB_1 e FB_2). Trento; Irgang; Reis (2002) relataram em cultivo de milho localizado em Passo Fundo, RS, safra 1999, que a incidência de grãos ardidos foi maior à medida que se aumentou a densidade de plantas (30, 40, 50, 60 e 70 mil plantas ha^{-1}). Similarmente, Sangoi *et al.* (2000) observaram que o aumento da população de plantas em Lages, SC, safra 1998, promoveu um

incremento na incidência das doenças de colmo causadas por *F. moniliforme*, *Colletotrichum graminicola* e *Diplodia maydis*. No entanto, os autores relataram que um (Ag 9012) dos quatro híbridos estudados (Ag 12, Ag 28 e Ag 303, Ag 9012), apresentou menor incidência e severidade das doenças de espiga, independentemente da densidade de semeadura.

Similarmente, no presente estudo, a correlação não significativa da dose populacional e a contaminação por fumonisinas (Tabela 1) e a diferença não significativa da toxina em relação às diferentes populações (Tabela 3) podem ser relacionadas ao híbrido utilizado (AG 9010). Este híbrido possui arquitetura de planta moderna, com as folhas eretas e resistência ao quebramento. Por isso, permite o plantio adensado, ou seja, o espaçamento reduzido entrelinhas, explorando as interações ambientais e agronômicas, que possibilita também o aumento da população de plantas (SEMENTES AGROCERES, 2010). A capacidade fotossintética de cada híbrido é outra característica que também pode influenciar na suscetibilidade à doenças e produção de micotoxinas, uma vez que interfere no fracionamento dos produtos oriundos da fotossíntese durante o período de enchimento de grãos. Trabalhos conduzidos por Russel (1991), Duvick (1994) e Sangoi; Ender; Guidolin (1998) demonstraram que os híbridos menos eficientes em termos fotossintéticos tiveram maior suscetibilidade a doenças de colmo. Além disso, a baixa contaminação de fumonisinas no presente estudo pode estar associada ao melhor empalhamento e à inclinação natural da espiga na maturação, características que têm sido priorizadas pelos programas de melhoramento genético de cultivares. Sangoi *et al.* (2000) relacionou o menor índice de doenças de espiga dos híbridos Ag 303 e Ag 9012 à maior dificuldade à entrada dos agentes causais na inflorescência feminina.

Os dados apresentados na Tabela 2 demonstram não haver diferença significativa ($p > 0,05$) entre os níveis médios de fumonisinas FB₁ e FB₂ em relação às diferentes doses de nitrogênio utilizadas (0, 50, 100 e 150 Kg ha⁻¹). Resultados similares foram encontrados por Miguel *et al.* (2009), os quais avaliaram a contaminação em grãos de milho cultivados na região Norte do Paraná, safra de 2007, submetidos a três doses de nitrogênio em cobertura (40, 120 e 200 Kg ha⁻¹). No entanto, os autores enfatizam que níveis mais elevados de fumonisinas foram observados em tratamentos nos quais não foi utilizado fertilizante nitrogenado. Blandino; Reyneri; Vanara (2008) relataram que o *stress* por falta de nitrogênio aumenta significativamente a contaminação de milho por FB₁. Diversos outros autores também relataram alta incidência de doenças causadas por fungos toxigênicos em milho devido ao *stress* por falta de fertilizante (SHELBY; WHITE; BAUSKE, 1994; RODRIGUEZ-DEL-BOSQUE, 1996; MILLER, 2001; MUNKVOLD, 2003). No presente estudo, a condição

de fertilidade natural do solo pode ter possibilitado uma nutrição equilibrada da planta, mesmo na ausência de nitrogênio em cobertura, e assim, propiciado à planta ter melhores condições de defesa contra patógenos.

Os teores de amido dos grãos analisados variaram de 30,73 a 48,18 %, os teores de cinzas de 1,13 a 2,57 %, lipídeos de 1,94 a 7,37 % e proteínas de 4,95 a 10,58 %. Observa-se ampla variabilidade entre os níveis mínimos e máximos para as análises físico-químicas, sendo estas influenciadas significativamente pelas doses de nitrogênio de cobertura utilizadas na adubação do solo e pela densidade populacional de plantas. Segundo FANCELLI; LIMA, (1982), a composição média dos grãos de milho é de 60 % de carboidratos, principalmente na forma de amido, 10 % de proteínas, 4 % de lipídeos, além de minerais e vitaminas.

É possível observar na Tabela 1 que a dose de nitrogênio em cobertura apresentou correlação significativa ($p < 0,05$) negativa com os teores de amido, e positiva com os teores de lipídeos e proteínas, ou seja, houve uma relação inversamente proporcional entre as doses de nitrogênio utilizadas e teores de amido; e uma relação diretamente proporcional entre as doses de nitrogênio e os teores de lipídeos e proteínas dos grãos de milho.

Resultados semelhantes foram encontrados por Gallo *et al.* (1976), os quais, utilizando o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio na cultura do milho, observaram que a aplicação de maiores doses aumentou a porcentagem de proteína nos grãos e diminuiu os teores de amido. Genter; Eheart; Linkous, (1956) e Jellum *et al.* (1973) também verificaram um aumento de proteína dos grãos com o aumento da dose de N aplicada, no entanto, não observaram nenhum efeito no teor de lipídeos. Nas variações observadas, em relação aos resultados obtidos nesse estudo, é preciso considerar as diferenças de tipo de solo, cultivares, época de cultivo, condições climáticas e possível interação da adubação com esses fatores. Em estudo com doses de nitrogênio de 0, 70, 140 e 210 kg ha⁻¹ na cultura do milho, no município de Coimbra, Estado de Minas Gerais, FERREIRA *et al.* (2001) constataram que os teores de proteína nos grãos aumentaram com as doses de nitrogênio.

O aumento dos níveis de proteína nos grãos de milho com as maiores doses de N está relacionado com a exigência deste elemento pelas plantas para realização de um ou mais processos vitais, como síntese de proteína, absorção iônica, fotossíntese, respiração, multiplicação e diferenciação celular (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1989). A deficiência de nitrogênio causa sérios distúrbios em plantas de milho, culminando na formação de espigas de tamanho reduzido, com grãos mal formados, e redução no teor de proteínas (FERREIRA, 1997).

A diminuição significativa do teor de amido dos grãos de milho com a utilização de fertilizante nitrogenado em comparação à sua ausência (Tabela 2) é similar a estudos que demonstram que a limitação de nitrogênio em plantas acarreta um aumento de carboidratos não-estruturais (Fichtner & Schulze 1992; Fichtner *et al.* 1993; Paul; Driscoll 1997; Scheible *et al.* 1997). O acúmulo de amido é uma resposta passiva à diminuição das taxas de crescimento e o resultante acúmulo de açúcares em plantas com falta de nutrientes (STITT; KRAPP, 1999). No entanto, pesquisas também demonstraram que o nitrato foi capaz de modular a diminuição dos teores de amido de uma maneira mais direta. Scheible *et al.* (1997) procederam estudo em tabaco deficiente de nitrogênio e relataram que os níveis de AgpS - o gene que codifica a subunidade reguladora da glicose pirofosforilase (AGPase), enzima chave na regulação da via de síntese de amido - diminuíram 2-4 horas após a adição de nitrato, e aumentaram após remoção do mesmo. De maneira similar, essas mesmas mudanças aconteceram após adição de nitrato em tabaco com baixa atividade de nitrato redutase, mostrando que o sinal está relacionado ao nitrato em si e não com a sua metabolização.

A correlação significativa e positiva do teor de lipídeo e as doses de nitrogênio em cobertura (Tabela 1) é corroborada com os dados da Tabela 2, os quais demonstram aumento significativo ($p < 0,05$) nos teores de lipídeos quando utilizou-se o fertilizante nitrogenado, em comparação à ausência do mesmo. Gallo *et al.* (1976), observaram, em experimentos realizados em Campinas-SP, correlação direta das doses de nitrogênio com o teor de lipídeos dos grãos. Similarmente, Marsaro Júnior *et al.* (2007), relataram que três das cinco cultivares de milho, cultivadas em diferentes sistemas de adubação (orgânica, mineral, orgânica e mineral combinadas), apresentaram as menores médias para porcentagem de lipídeos na ausência de adubação, indicando que a disponibilidade de minerais no solo pode influenciar na produção de lipídeos.

Com relação à densidade populacional, mediante análise dos dados da Tabela 1, esta teve correlação significativa com as análises físico-químicas de amido, cinzas e lipídeos. Sendo, diferentemente do observado com a dose de fertilizante nitrogenado, a correlação da densidade de plantas com o teor de amido foi positiva, ou seja, quanto maior o número de plantas ha^{-1} , maiores foram os níveis de amido quantificados nos grãos. Havendo para tal, diferença significativa ($p < 0,05$) nos níveis médios de amido entre o tratamento com menor densidade populacional (40 mil plantas ha^{-1}) e os demais tratamentos (60, 80 e 100 mil plantas ha^{-1}), conforme é possível constatar na Tabela 3.

A correlação existente entre a densidade populacional e os teores de cinzas e lipídeos foi negativa, isto é, houve uma relação inversamente proporcional entre estas variáveis. Sendo

que os teores médios de cinzas e lipídeos relativos aos tratamentos com menor densidade populacional (40 mil plantas ha⁻¹) diferiram significativamente ($p < 0,05$) dos tratamentos com maior densidade (60, 80 e 100 mil plantas ha⁻¹), conforme Tabela 3. O fato pode ser explicado pela densidade de semeadura afetar o balanço nutricional nos diferentes órgãos da planta de milho. O aumento da densidade de semeadura aumenta a competição entre indivíduos por água, luz e nutrientes, reduzindo a disponibilidade de fotoassimilados para atender a demanda para enchimento do grão e manutenção das demais estruturas da planta (SANGOI; SALVADOR, 1997), e, em consequência disto, menor a síntese e acúmulo de lipídeos e cinzas.

A diminuição dos teores de amido com a menor densidade populacional pode estar relacionada à melhor distribuição das plantas na área, possibilitando assim, a maximização da atividade fotossintética pós-antese. Como consequência, há maior produção de grãos, porém com menor teor de carboidratos, em vista da distribuição deste entre os grãos. Penariol *et al.* (2003) e Amaral Filho *et al.* (2005), os quais estudaram densidades de plantas de 40.000 a 80.000 plantas ha⁻¹, observaram que as menores densidades populacionais de milho resultaram em maiores números de grãos por espiga.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) em associação com o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), à Fundação Araucária, ao UGF Fundo Paraná-SETI e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) – Projeto Nanobiotecnologia (04/CII-2008) pelo suporte financeiro.

Referências

- AMARAL FILHO, J. P. R.; FORNASIERI FILHO, D.; FARINELLI, R.; BARBOSA, J. C. Espaçamento, densidade populacional e adubação nitrogenada na cultura do milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 467-473, 2005.
- ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 16. ed. AOAC, cap. 49, p. 35-36, 1995.
- BEZUIDENHOUT, S. C.; GELDERBLUM, W. C. A.; GORST-ALLMAN, C. P.; HORAK, R. M.; MARASAS, W. F. O.; SPITELLER, G. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society – Chemical Communications**, v. 19, p. 743–745, 1988.

- BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F. Influence of nitrogen fertilization on mycotoxin contamination of maize kernels. **Crop Protection**, v. 27, p. 222-230, 2008.
- BRADY, N.C. **Natureza e propriedades dos solos**. Rio de Janeiro, 898p., 1989.
- CAHAGNIER, B.; MELCION, D.; RICHARD-MOLARD, D. Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B₁ on maize grain as a function of different water activities. **Letters Applied of Microbiology**, v. 20, p. 247-251, 1995.
- CASA, R. T.; REIS, E. M. Doenças na cultura do milho. In: **Milho: estratégias de manejo para alta produtividade**. Piracicaba: ESALQ/USP, v.4, p.1-18, 2003.
- CONAB- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Safras de grãos: Brasil/produtores**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em 11 de Março de 2010.
- DUVICK, D.N. Maize breeding: past, present and future. In: Congresso Brasileiro de Milho e Sorgo, v. 20. 1994. Goiânia, GO. **Anais...Goiânia**, Embrapa-CNPMS, 470 p. p. 170-179, 1994.
- EMBRAPA. **Nutrição e Adubação do Milho**. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/feraduba.htm>>. Acesso em 15 fevereiro 2009.
- FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Introdução In: **Produção de milho**. 1. ed. Rio Grande do Sul: Agropecuária, cap.1, p. 21, 2000.
- FANCELLI, A.L.; LIMA, U.A. **Milho: produção, pré-processamento e transformação agroindustrial**. São Paulo: SICCI; PROMOCET; FEALQ, 112p. (Série Extensão Agroindustrial, 5), 1982.
- FERREIRA, A. C. B. **Efeitos da adubação com N, Mo e Zn sobre a produção, qualidade dos grãos e concentração de nutrientes no milho**. 1997. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.
- FERREIRA, A. C. B.; ARAÚJO, G. A. A.; PEREIRA, P. R. G.; CARDOSO, A. A. Características agronômicas e nutricionais do milho adubado com nitrogênio, molibdênio e zinco. **Scientia Agricola**, v. 58, n.1, p.131-138, 2001.
- FICHTNER, K.; SCHULZE, E. D. The effect of nitrogen nutrition on annuals originating from habitats of different nitrogen availability. **Oecologia**, v. 92, p. 236–241, 1992.
- FICHTNER, K.; QUICK, W. P.; SCHULZE, E. D.; MOONEY, H. A.; RODERMEL, S. R.; BOGORAD, L.; STITT, M. Decreased ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase in transgenic tobacco transformed with ‘antisense’ *rbcS*. V. Relationship between photosynthetic rate, storage strategy, biomass allocation and vegetative plant growth at three different nitrogen supplies. **Planta**, v.190, p.1-9, 1993.
- GALLO, J. R.; TEIXEIRA, J. P. F.; SPOLADORE, D. S.; IGUE, T.; DE MIRANDA, L. T. Influência da adubação nas relações entre constituintes químicos dos grãos, dos grãos e das folhas, e a produção de milho. **Bragantia**, Revista Científica do Instituto Agronômico do Estado de São Paulo, v. 35, n. 36, p. 413-432, 1976.
- GENTER, O. F.; EHEART, J. F.; LINKOUS, W. N. Effects of location, hybrid, fertiliser, and rate of planting of the oil and protein contents of corn grain. **Agronomy Journal**, 48:63-67, 1956.
- I.A.L. – Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos**, 533p., v. 1, 1985.

IAPAR. **Monitoramento Agroclimático do Paraná.** Disponível em: <<http://200.201.27.14/Site/Sma/Index.html>>. Acesso em: 20 abril 2010.

International Agency for Research on Cancer – World Health Organization (IARC-WHO). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and atyrene. In **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human**, Lyon: IARC Working Group, World Health Organization, v. 82, pp. 301, 2002.

JELLUM, M. D.; BOSWELL, F. C.; YOUNG, C. T. Nitrogen and boron effects on protein and oil of corn grain. **Agronomy Journal**, v. 65, p. 330-331, 1973.

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

LISKER, N.; LILLEHOJ, E.B. **Prevention of mycotoxin contamination** (Principally aflatoxins and *Fusarium* toxins) at the Preharvest Stage, 1991.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, A.S. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 201p., 1989.

MARSARO JÚNIOR, A. L.; LAZZARI, S. M. N.; DE SOUZA, J. L.; LAZZARI, F. A.; CÂNDIDO, L. M. B. Influência de diferentes sistemas de adubação na composição nutricional do milho *Zea mays* L. (Poaceae) e seus efeitos no ataque de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) no produto armazenado. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 51-64, 2007.

MIGUEL, T. A.; BERND, L. P.; OKUMURA, R. S.; TAKAHASHI, H. W.; TAKABAYASHI, C. R.; ONO, M. A.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Effect of nitrogen fertilizer on fungal and fumonisina contamination in freshly harvested corn. **World Mycotoxin Reduction in Food and Feed Chains**. ISM Conference, 9 – 11, Tulln, Austria, 2009.

MILLER, J.D. Factors that Affect the Occurrence of Fumonisin. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 2, p. 321 - 324, 2001.

MORENO, E. C.; GARCIA, G. T.; ONO, M. A.; VIZONI, E.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. **Food Chemistry**. v. 116, p. 220-226, 2009.

MUNKVOLD, G.P. Cultural and Genetic Approaches to Managing Mycotoxins in Maize. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, p. 99 - 116, 2003.

NELSON, N.A. Photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. **Journal Biological Chemistry**, v. 153, p.375-380, 1944.

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.

NHEMI, I.M.D.; FERRAZ, J.V.; NHEMI FILHO, V.A., SILVA, M.L.M. Milho: a diferença aparece no manejo. In: **Agriannual 2004: Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: Argos, p.377 – 378, 2004.

PAUL, M.; DRISCOLL, S. P. Sugar repression of photosynthesis during N deficiency. **Plant, Cell Environment**, v. 20, p. 110–116, 1997.

- PENARIOL, F. G.; FORNASIERI FILHO, D.; COICEV, L.; BORDIN, L.; FARINELLI, R. Comportamento de cultivares de milho semeadas em diferentes espaçamentos entre linhas e densidades populacionais, na safrinha. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 2, p. 52-60, 2003.
- RIBEIRO, N. A.; CASA, R. T.; BOGO, A.; SANGOI, L.; WILLE, L. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e produtividade de grãos de genótipos de milho em diferentes sistemas de manejo. **Ciência Rural**, v. 35, p. 1003-1009, 2005.
- RODRIGUEZ-DEL-BOSQUE, L. A. Impact of agronomic factors on aflatoxin contamination in preharvest field corn in Northeastern Mexico. **Plant Disease**, v. 80, p. 988 - 993, 1996.
- RUSSELL, W. A. Genetic improvement of maize yields. **Advances in Agronomy**, v. 46, p. 245-298, 1991.
- SANGOI, L.; SALVADOR, R. J. Dry matter production and partitioning of maize hybrids and dwarf lines at four plant populations. **Ciência Rural**, v. 27, n.1, p.1-6, 1997.
- SANGOI, L.; ENDER, M.; GUIDOLIN, A. F. Dominância apical de híbridos de milho de diferentes épocas em três densidades de semeadura. In: **Reunião Anual do Milho e Sorgo**, 42, 1997. C, SC. Anais... Erechim, Cotel/Emater/Fepagro, 382p., p. 31-36., 1998.
- SANGOI, L.; ENDER, M.; GUIDOLIN, A. F.; BOGO, A.; KOTHE, D. M. Incidência e severidade de doenças de quatro híbridos de milho cultivados em diferentes densidades de planta. **Ciência Rural**, v. 30, p.17-21, 2000.
- SANGOI, L. Understanding plant density effects on maize growth and development: an important issue to maximize grain yield. **Ciência Rural**, v.31, p.159-168, 2001.
- SANGOI, L.; SILVA, P.R.F.; ARGENTA, G.; HORN, D. Bases morfo-fisiológicas para aumentar a tolerância de cultivares de milho a altas densidades de plantas. In: **Reunião Técnica Catarinense de Milho e Feijão**, 4., Lages, SC. Resumos Expandidos. Lages: CAV- UDESC, p.19-24, 2003.
- SEMENTES AGROCERES. AG 9010 YG. Disponível em: http://www.sementesagroceres.com.br/milho_safrinha.asp?produto=ag_s_9010&h=1000. Acesso em: 05 janeiro 2010.
- SCHEIBLE, W. R.; GONZALES-FONTES, A.; LAUERER, M.; MÜLLER-RÖBER, B.; CABOCHE, M.; STITT, M. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. **Plant Cell**, v 9, p. 783–798, 1997.
- SHELBY, R.A.; WHITE, D.G.; BAUSKE, E.M. Differential Fumonisin Production in Maize Hybrids. **Plant Disease**, v. 78, p. 582 - 584, 1994.
- SHEPHARD, G. S.; SYDENHAM, E. W.; THIEL, P. G.; GELDERBLUM, W. C. A. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v.13, p.2077-2087, 1990.
- SHIOGA, P. S.; OLIVEIRA, E. L.; GERAGE, A. C. Densidade de plantas e adubação nitrogenada em milho cultivado na safrinha. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 3, n. 3, p. 381-390, 2004.
- SILVA, P. R. F.; SANGOI, L.; ARGENTA, G.; STRIEDER, M. L. **Arranjo de plantas e sua importância na definição da produtividade em milho**. Porto Alegre: Evangraf, 63p., 2006.

- SODEK, L. Mecanismos bioquímicos de enchimento de grãos em leguminosa. IN: **Reunião Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 2, Piracicaba: 1989. Anais. Piracicaba, SBFV/ESALQ, p.115-121, 1989.
- SOMOGY, M. Determination of blood sugar. **Journal Biological Chemistry**, v. 160, p. 69-73, 1945.
- STITT, M.; KRAPP, A. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. **Plant, Cell and Environment**, v. 22, p. 583 – 621, 1999.
- SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v.43, p.141-158, 1998.
- TRENTO, S. M.; IRGANG, H. H.; REIS, E. M. Efeito da rotação de culturas, da monocultura e da densidade de plantas na incidência de grãos ardidos em milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 6, p. 609-613, 2002.
- 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.
- WALTER, M.; SILVA, L. P. da; PERDOMO, D. M. X. Amido disponível e resistente em alimentos: Adaptação do método da AOAC 996.11. **Alimentos e Nutrição**, v.16, n.1, p.39-43, 2005.
- 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.

Tabela 1 - Correlação entre doses de nitrogênio, população de plantas e contaminação por fumonisinas, teores de amido, cinzas, proteínas e lipídeos

Variáveis	Dose de N (Kg ha ⁻¹)	População (plantas ha ⁻¹)	Fumonisinias		Amido (%)	Cinzas (%)	Lipídeos (%)	Proteínas (%)
			FB ₁ (µg g ⁻¹)	FB ₂ (µg g ⁻¹)				
Dose de N (Kg ha ⁻¹)	ρ=1,00 p=---	ρ=0,00 p=1,00	ρ=0,11 p=0,35	ρ=-0,05 p=0,69	ρ=-0,40** p=0,00	ρ=0,18 p=0,13	ρ=0,29** p=0,01	ρ=0,50** p=0,00
População (plantas ha ⁻¹)		ρ=1,00 p=---	ρ=-0,05 p=0,65	ρ=0,04 p=0,71	ρ=0,55** p=0,00	ρ=-0,50** p=0,00	ρ=-0,65** p=0,00	ρ=-0,22 p=0,07
FB ₁ (µg g ⁻¹)			ρ=1,00 p=---	ρ=0,72** p=0,00	ρ=-0,23 p=0,06	ρ=0,21 p=0,08	ρ=0,13 p=0,27	ρ=0,20 p=0,09
FB ₂ (µg g ⁻¹)				ρ=1,00 p=---	ρ=-0,05 p=0,67	ρ=0,05 p=0,64	ρ=0,03 p=0,76	ρ=0,11 p=0,35
Amido (%)					ρ=1,00 p=---	ρ=-0,68** p=0,00	ρ=-0,62** p=0,00	ρ=-0,42** p=0,00
Cinzas (%)						ρ=1,00 p=---	ρ=0,70** p=0,00	ρ=0,46** p=0,00
Lipídeos (%)							ρ=1,00 p=---	ρ=0,63** p=0,00
Proteínas (%)								ρ=1,00 p=---

**Correlações significantes a $p < 0,05$, ρ = correlações, p = nível de significância.

Tabela 2 - Quantificação de fumonisinas e análises físico-químicas em relação às doses de nitrogênio

Variáveis	Dose de nitrogênio (Kg ha ⁻¹)			
	0	50	100	150
FB ₁ (μg g ⁻¹)	0,44 ± 0,43 ^a	0,54 ± 0,60 ^a	0,45 ± 0,64 ^a	0,67 ± 0,64 ^a
FB ₂ (μg g ⁻¹)	0,29 ± 0,33 ^a	0,52 ± 1,07 ^a	0,23 ± 0,31 ^a	0,30 ± 0,42 ^a
Amido (%)	42,20 ± 3,32 ^a	39,02 ± 3,95 ^b	38,74 ± 3,81 ^b	37,55 ± 3,54 ^b
Cinzas (%)	1,56 ± 0,32 ^a	1,83 ± 0,35 ^a	1,77 ± 0,36 ^a	1,77 ± 0,27 ^a
Lipídeos (%)	4,45 ± 1,04 ^b	5,21 ± 0,93 ^a	5,19 ± 0,84 ^a	5,33 ± 1,00 ^a
Proteínas (%)	7,19 ± 1,05 ^c	7,69 ± 0,66 ^{b,c}	8,09 ± 0,62 ^{a,b}	8,49 ± 0,99 ^a

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

Tabela 3 - Quantificação de fumonisinas e análises físico-químicas em relação à população de plantas (plantas ha⁻¹)

Variáveis	População de plantas (plantas ha ⁻¹)			
	40 mil	60 mil	80 mil	100 mil
FB ₁ (μg g ⁻¹)	0,76 ± 0,68 ^a	0,28 ± 0,34 ^a	0,45 ± 0,53 ^a	0,61 ± 0,64 ^a
FB ₂ (μg g ⁻¹)	0,46 ± 0,43 ^a	0,13 ± 0,23 ^a	0,26 ± 0,43 ^a	0,50 ± 1,03 ^a
Amido (%)	35,43 ± 2,79 ^b	39,76 ± 3,23 ^a	40,66 ± 3,85 ^a	41,67 ± 3,02 ^a
Cinzas (%)	2,03 ± 0,26 ^a	1,70 ± 0,39 ^b	1,66 ± 0,28 ^b	1,54 ± 0,16 ^b
Lipídeos (%)	6,15 ± 0,64 ^a	4,95 ± 0,99 ^b	4,83 ± 0,73 ^{b,c}	4,25 ± 0,47 ^c
Proteínas (%)	8,44 ± 0,91 ^a	7,58 ± 1,00 ^b	7,67 ± 0,91 ^b	7,77 ± 0,85 ^{a,b}

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

5.7 Efeito da Inoculação a base de *Pseudomonas fluorescens* e adubação NPK nas características químicas, contaminação por fungos e fumonisinas em grãos de milho

RESUMO

A disponibilização de nutrientes e o estímulo ao crescimento proporcionado pelas rizobactérias pode favorecer a produtividade e a qualidade de produtos agrícolas, reduzindo a necessidade de insumos externos e os riscos ambientais. Em face disto, o trabalho teve como objetivo avaliar a atuação de *Pseudomonas fluorescens* inoculada na cultura de milho sob diferentes níveis de adubação NPK na composição química, contaminação por fungos e fumonisinas em grãos do híbrido P30F35 na segunda safra de 2009. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com arranjo fatorial 3x2, correspondente a três níveis de adubação NPK no sulco de semeadura (0, 125 e 250 kg ha⁻¹ do formulado 08-28-16) e dois de inoculante a base de *P. fluorescens* (com e sem), com 4 repetições. Os diferentes níveis de adubação, a presença e ausência de inoculação com *P. fluorescens* e a interação entre estes fatores não se mostraram significativos para a porcentagem de proteína e de fumonisinas ($p > 0,05$). A interação entre os fatores mostrou-se significativa na contagem de leveduras e no teor de cinzas, sendo que a última resposta apresentou correlação significativa com o teor de proteína dos grãos. A adubação com 250 Kg ha⁻¹ de NPK, aliada à inoculação com rizobactérias, proporcionou aumento nos teores de minerais nos grãos de milho. O mesmo tratamento indicou inibição do crescimento de leveduras, porém a correlação significativa negativa entre estas e *Fusarium* spp., demonstrou que mesmo com a inoculação com *P. fluorescens*, este gênero teve condições de crescimento. O uso de rizobactérias vem a ser uma alternativa ao uso de fertilizantes, pesticidas e fungicidas, porém, as restrições hídricas e geadas no período de desenvolvimento da cultura representaram condições desfavoráveis para a plena atuação de *P. fluorescens* no milho.

Palavras-chave: *Zea mays*, proteína, cinzas, rizobactérias, biocontrole.

ABSTRACT

The availability of nutrients and growth stimulation provided by rhizobacteria can promote productivity and quality of agricultural products, reducing the need for external inputs and environmental risks. The work aimed to evaluate the performance of *Pseudomonas fluorescens* inoculated in corn under different NPK levels on chemical composition, fungal and fumonisin contamination in hybrid P30F35 (2009 crop). The experimental was randomized blocks with 3x2 factorial design, corresponding to three NPK levels (0, 125 and 250 kg ha⁻¹, formulated 08-28-16) and two inoculation-based *P. fluorescens* (with and without), with four replications. The different fertilization levels, the presence and absence of *P. fluorescens* inoculation and interaction between these factors were not significant for protein and fumonisins levels ($p > 0.05$). The interaction between factors was significant for yeast count and mineral content, and the last was significantly correlated with protein content of grains. Fertilization with 250 kg ha⁻¹ NPK, allied to inoculation with rhizobacteria, allowing higher minerals levels on corn and showed yeasts growth inhibition. A significant negative correlation between yeasts and *Fusarium* sp. demonstrated that even with *P. fluorescens* inoculation, this genre had growing conditions. Rhizobacteria use has become an alternative to fertilizers, pesticides and fungicides, however, the climate conditions during culture growth represented unfavorable conditions for the performance of *P. fluorescens* in corn.

Keywords: *Zea mays*, protein, mineral, rhizobacteria, biocontrol.

Introdução

O milho é um dos produtos que mais se destaca em volume de produção dentre os cereais e oleaginosas produzidos no Brasil. Segundo a CONAB (2010), a produção brasileira total de grãos 2009/2010 é estimada em 143,95 milhões de toneladas, sendo que a safra de milho deve alcançar a produção de 51,3 milhões de toneladas. No cenário, o Estado do Paraná ocupa posição estratégica pela maior produção de grãos, com destaque para o milho, com uma estimativa de produção de 11,5 milhões de toneladas.

Este cereal é hospedeiro de algumas espécies fúngicas produtoras de micotoxinas, dentre as quais se destaca o *Fusarium verticillioides*, produtor de fumonisinas, toxinas associadas com efeitos nocivos à saúde humana e animal (MARASAS; NELSON; TOUSSON, 1984; NORRED, 1993). Fumonisin, principalmente a B₁ (FB₁), tem sido associada à micotoxicoses em animais, como leucoencefalomalácia em equinos (SYDENHAN *et al.*, 1992), síndrome de edema pulmonar em suínos (ROSS *et al.*, 1990) e câncer hepático em ratos (GELDERBLOM *et al.*, 1992). Estas toxinas foram detectadas em milho e em produtos derivados deste cereal comercializados em alguns países (MARASAS, 1995), sendo relacionados em seres humanos à ocorrência de câncer esofágico (MARASAS *et al.*, 1988; FRANCESCHI, *et al.*, 1990; LI *et al.*, 2001), e a defeitos do tubo neural de fetos (GELINEAU-VAN WAES *et al.*, 2009). As fumonisinas da série B são encontradas sob condições naturais e em comparação aos outros análogos (A, C e P) são as mais abundantes. A FB₁ compreende de 70 a 80 % do total de fumonisinas produzidas pelas espécies fúngicas, e a FB₂ constitui de 15 a 25 % (RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002). Devido aos efeitos nocivos associados à presença de espécies de *Fusarium* em culturas agrícolas, o controle de *F. verticillioides* e a conseqüente produção de fumonisinas em milho tem se tornado uma prioridade na investigação de segurança dos alimentos (Brown *et al.*, 2001).

As estratégias de controle, objetivando a redução da infecção por fitopatógenos em cereais, leguminosas e oleaginosas são geralmente baseadas no uso de pesticidas químicos (Kanampiu; Friesen; Gressel, 2002). O massivo uso destes produtos promove a poluição da água, degradação do solo e aumento da resistência de insetos (PEREIRA *et al.*, 2010). O uso de agentes de controle biológicos com efeitos antagonistas em patógenos pode representar uma alternativa promissora (WHIPPS, 1997; BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001). Dentre estes, destacam-se as rizobactérias, que não só se beneficiam dos nutrientes secretados pelas raízes das plantas, como também favorecem a planta de forma direta ou indireta (BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001). Os efeitos diretos são dependentes da produção de

reguladores de crescimento, ou a melhoria da absorção de nutrientes pela planta; por outro lado, os efeitos indiretos estão relacionados com a produção de metabólitos como antibióticos, sideróforos e ácido hidrocianico, que diminuem o crescimento de fitopatógenos e outros microorganismos nocivos à planta (GLICK, 1995; MYOUNGSU *et al.*, 2005). Hernández-Rodríguez *et al.* (2008) relataram que rizobactérias (*Burkholderia* spp. e *Pseudomonas fluorescens*) exibiram efeito antagonista em *F. verticillioides* M1 inoculado em milho. *Pseudomonas fluorescens* (cepas MKB 158 e MKB 249) e *Pseudomonas frederiksbergensis* (cepa 202) reduziram significativamente a gravidade de doenças causadas por *Fusarium culmorum* no trigo e cevada (Khan; Doohan, 2009).

De acordo com Oliveira; Urquiaga; Baldani (2003), o crescimento vegetal por estas bactérias pode ser promovido pela combinação de um ou mais dos seguintes mecanismos: produção de fitohormônios, fixação biológica de nitrogênio, controle biológico de patógenos, solubilização de fósforo inorgânico e outros nutrientes, e mineralização de fósforo orgânico. As bactérias do gênero *Pseudomonas* têm recebido especial atenção por sua capacidade em promover o crescimento vegetal, especialmente pela sua habilidade em melhorar a nutrição fosfatada das plantas pela solubilização de fontes não disponíveis de fósforo (AFZAL; BANO, 2008). A diversidade metabólica das *P. fluorescens* permite a sua adaptação em vários ambientes, tais como solo e rizosfera (LATOURE; LEMANCEAU, 1997).

O milho, por apresentar alto potencial produtivo, é uma das culturas mais exigentes em fertilizantes, especialmente os nitrogenados e fosfatados. O suprimento inadequado de nitrogênio é considerado um dos principais fatores limitantes ao rendimento de grãos do milho, pois o mesmo exerce importantes funções nos processos bioquímicos da planta. Além disto, a fertilização nitrogenada constitui uma das alternativas para minimizar a ocorrência de fumonisinas, uma vez que a biossíntese dessas micotoxinas está relacionada à limitação de nitrogênio (SHIM; WOLOSHUK, 1999). Entretanto, o excesso de nitrogênio provoca crescimento vegetativo prolongado, tornando as folhas mais expostas aos patógenos, com a parede celular tornando-se mais delgada e vulnerável à penetração de fungos (REID; ZHU; MA, 2001).

Além do nitrogênio, a deficiência de fósforo também limita a produtividade da cultura, sendo esta mais exigente a fósforo por ocasião da formação e desenvolvimento dos grãos. O fósforo está relacionado com o crescimento das raízes, a maturação de frutos, a formação de grãos, frutos e fibras e com o vigor das plantas (VITTI; WIT; FERNANDES; 2004). Aliado a isto, plantas de milho expostas ao estresse por falta de fertilidade do solo são altamente

susceptíveis à infecção por fungos toxigênicos (MILLER, 2001; WIDSTROM, 1996; BLANDINO; REYNERI; VANARA, 2008).

Apesar da perspectiva de utilização de rizobactérias com o propósito de bioproteção e crescimento vegetal, ainda é imprescindível o fornecimento de nutrientes para a cultura. Contudo, as respostas da planta em relação à interação desses fatores ainda são desconhecidas, pois a fertilidade natural do solo ou as doses de adubação fornecidas podem influenciar o comportamento das bactérias quanto à sobrevivência, reprodução e eficiência de atuação, alterando o desenvolvimento da planta, a produtividade e a qualidade do produto.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar, em condições de campo, o efeito da inoculação com *Pseudomonas fluorescens* na cultura do milho sob diferentes níveis de adubação NPK, sobre a composição química dos grãos e a contaminação por fungos e fumonisinas.

Material e Métodos

Híbrido de milho

O híbrido de milho utilizado foi P30F35 (Pioneer[®]), que apresenta ciclo precoce, elevada capacidade de adaptação para a safrinha com alto potencial produtivo (PIONEER SEMENTES, 2009).

Caracterização da área experimental

O experimento foi conduzido no período de segunda safra (safrinha) no ano de 2009 no município de Londrina, o qual se encontra a 23°22' latitude Sul, 51°22' longitude Oeste de Greenwich, com altitude de 580 m. O solo do local é caracterizado como Latossolo Vermelho eutroférico (EMBRAPA, 1999). O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é Cfa, ou seja, clima subtropical, com temperatura média no mês mais frio inferior a 18 °C (mesotérmico) e temperatura média no mês mais quente acima de 22 °C, com verões quentes, geadas pouco frequentes e tendência de concentração das chuvas nos meses de verão, contudo sem estação seca definida (IAPAR, 2010). As temperaturas máximas e mínimas diárias assim como, a precipitação pluviométrica diária durante o período de condução do experimento, fornecidas pela estação Meteorológica do Instituto Agrônomo do Paraná, situada a 5 km da área experimental, estão apresentadas na Figura 1.

Delineamento experimental

Foram avaliadas três doses de adubação NPK (0, 50 e 100 % da indicação técnica da cultura) e a inoculação ou não de sementes de milho com inoculante à base de *P. fluorescens*. Para tal, foi utilizado o delineamento experimental de blocos casualizados, em esquema fatorial 3x2, com quatro repetições.

As parcelas foram constituídas de quatro linhas de cinco metros de comprimento, com espaçamento entre linhas de 0,9 m. Foram consideradas como parcela útil as duas linhas centrais, desprezando-se 0,5 m das extremidades das mesmas.

Procedimento operacional

Previamente à instalação do experimento foram coletadas amostras de solo da área experimental a profundidade de 0-10 e 10-20 cm para análise química (Tabela 1), de acordo com a metodologia de RAIJ; QUAGGIO (1983). Com base nestes resultados, foi realizada a adubação do solo com nitrogênio, fósforo e potássio (N-P-K) no sulco da semeadura com o fertilizante formulado 08-28-16, de acordo com os tratamentos de 0, 50 e 100 % das indicações técnicas da cultura (EMBRAPA, 2009). Estas quantidades foram de 0, 125 e 250 Kg ha⁻¹ do formulado, respectivamente, sendo que a maior dose (250 kg ha⁻¹) correspondeu a 20 kg ha⁻¹ de N, 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 40 kg ha⁻¹ de K₂O. O solo foi preparado quando o mesmo apresentava condições adequadas de umidade, realizando-se uma aração e uma gradagem.

Anteriormente à semeadura, as sementes que receberam o inoculante à base de *P. fluorescens* foram tratadas na dose de 140 mL ha⁻¹, sendo que destes, 100 mL correspondeu ao Rizofos liq Maíz[®] e 40 mL, ao Premax R Protector[®], protetor bacteriano que melhora a sobrevivência das bactérias após a inoculação, sendo este misturado ao Rizofos liq Maíz[®] antes da aplicação nas sementes.

A semeadura foi realizada manualmente e para atingir a densidade de aproximadamente 55 mil plantas ha⁻¹, realizou-se desbaste na fase de desenvolvimento V₃, utilizando a escala fenológica da cultura proposta por RITCHIE; HANWAY; BENSON (1986).

Durante o desenvolvimento da cultura, a área foi monitorada com relação à pragas, doenças e plantas daninhas. Houve a necessidade de utilização de *Teflubenzuron* na dosagem de 100 mL ha⁻¹ para controle de vaquinha (*Diabrotica speciosa*), devido à desfolha causada pelo inseto adulto no estágio V₃. Além disto, a eliminação de plantas daninhas foi realizada mediante capina manual.

A adubação nitrogenada de cobertura foi realizada aos 35 dias após a emergência das plântulas (estádio V₆), com aplicação de 80 kg ha⁻¹ de N (uréia) em todos os tratamentos. A colheita foi realizada manualmente no estágio 10 (grãos com umidade de 20 %), nas linhas centrais da área útil da parcela.

Determinação de fumonisinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A determinação de fumonisinas foi realizada por CLAE de acordo com a metodologia descrita por Shephard *et al.* (1990), modificada por Ueno *et al.* (1993). Para extração, um volume de 30 mL de metanol: água (3:1, v:v) foi adicionado a 10 g de amostra triturada (50 mesh), seguido de agitação a 150 r.p.m. por 1 hora a 10 °C (incubadora refrigerada Marconi[®]). Após filtração, foi aplicado 1 mL do extrato bruto em coluna de troca aniônica Sep-Pak accell plus QMA (Waters Co., Ltda) previamente acondicionada com 5 mL de metanol, seguido de 5 mL de metanol:água (3:1, v:v). Em seguida, foram aplicados 6 mL de metanol:água (3:1, v:v), seguidos de 3 mL de metanol. As fumonisinas foram eluídas com 10 mL de solução de ácido acético 0,5 % em metanol e o eluato seco a 40 °C. O resíduo foi ressuspenso em 2 mL de metanol:água (3:1, v:v), seco sob gás N₂ a 40 °C e novamente ressuspenso em 800 µL de metanol:água (3:1, v:v). Alíquotas de 200 µL foram secas em gás N₂ a 40 °C. Uma alíquota de 200 µL foi ressuspenso em 100 µL de acetonitrila:água (1:1), derivatizada com 200 µL de o-phtaldialdeído (40 mg de OPA, 1 mL de metanol, 5 mL de borato de sódio a 0,1 mol L⁻¹ e 50 µL de 2- mercaptoetanol) e as injeções foram feitas dentro de 1 min em CLAE. Fumonisinas foram analisadas em sistema isocrático de fase reversa por CLAE (bomba LC-10 AD e detector de fluorescência RF 535, Shimadzu, Japão), usando coluna C₁₈ Luna 5 µ (4,6 x 250 mm; Phenomenex[®], EUA). Foi utilizado comprimento de onda de 335 nm e 450 nm de excitação e emissão, respectivamente. A fase móvel consistiu de metanol: fosfato de sódio (CH₃OH:Na₂HPO₄) 0,1 M (80:20, v:v) ajustado com ácido o-fosfórico a pH 3,3, fluxo de 1 mL min⁻¹. O limite de detecção de FB₁ e FB₂ foi 27,5 e 35,3 ng g⁻¹, respectivamente.

Determinação de proteínas e cinzas

O teor de proteína bruta foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995), convertendo-se o teor total de N em proteína pelo uso do fator 6,25. Os teores de cinzas foram determinados mediante pesagem de resíduos de incineração, conforme I.A.L. (1985).

Análise da microbiota fúngica

Uma alíquota de 10 g de milho triturado (50 mesh) foi homogeneizada em 90 mL de água peptonada estéril 0,1 % (v/v) e submetida a diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) em tubos contendo o mesmo diluente. Uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição foi plaqueada em Ágar batata dextrose (BDA), acidificado a pH 4,0 com ácido tartárico. As placas foram incubadas a 25 °C por 5 dias e após a contagem, os gêneros fúngicos foram identificados de acordo com Nelson; Toussoun; Marasas (1983) e Samson; Hoeskstra; Frisvad (1995).

Análise Estatística

Os resultados obtidos foram estatisticamente avaliados usando análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Comparação Múltipla de Tukey, a 95 % de confiança. A correlação de Pearson foi analisada pelo teste-t, sendo as análises estatísticas realizadas no programa “Statistica, versão 6.0”. Os valores referentes à contagem de bolores e leveduras foram convertidos em escala logarítmica antes de serem submetidos à análise estatística.

Resultados e Discussão

O teor de proteína dos grãos de milho variou de 9,64 a 14,19 % (base seca), sendo o nível mais baixo detectado na ausência de adubação NPK e o mais alto, quando procedeu-se à adubação na semeadura com 250 Kg ha⁻¹, ambos com inoculação de *P. fluorescens*. No entanto, os diferentes níveis de adubação, a presença/ ausência de inoculação com *P. fluorescens* e a interação entre estes fatores não mostraram efeitos significativos para a porcentagem média de proteína nos grãos de milho, como pode ser observado na Tabela 2. Resultados similares foram relatados por Gallo; Teixeira; Spoladore (1976) e por Pommer; Sawazaki (1981), os quais verificaram que o teor percentual de proteína na matéria seca dos grãos de milho não foi alterado significativamente pela adubação contínua com NPK em ensaio no município de Campinas – SP; por outro lado, em Mococa – SP, o teor protéico percentual foi influenciado significativamente pelo nitrogênio. As respostas da planta à adubação dependem de diversos fatores, além da variação do suprimento de nutrientes, destacando-se a importância do clima e do tipo de solo na disponibilidade dos nutrientes.

As rizobactérias inoculadas nas culturas exercem efeitos benéficos ao promover o crescimento vegetal, devido principalmente ao aumento da disponibilidade de nutrientes para as plantas, pela solubilização de fosfato inorgânico (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999) e pelo maior crescimento da raiz favorecendo a absorção de nutrientes pelos grãos. No entanto, as condições climáticas durante o período de condução do experimento não foram adequadas

para a cultura do milho, pois ocorreram escassez hídrica e baixa temperatura com registros de geadas, conforme demonstrado na Figura 1. Esse fato afetou a mobilização de nutrientes para os grãos de milho, uma vez que a absorção e translocação de minerais pela planta requer umidade no solo; elucidando assim, a diferença não significativa dos teores médios de proteína nos grãos de milho no presente estudo sob os diferentes teores de adubação com NPK (Tabela 2).

Além disto, estudos demonstram que variações nas doses de nitrogênio em cobertura mostram-se eficazes no aumento da produtividade e teores de proteína nos grãos (FERREIRA *et al.*, 2001; GALLO *et al.*, 1976; GENTER; EHEART; LINKOUS, 1956). Adubação com nitrogênio em cobertura parece refletir em maiores teores de proteína nos grãos em comparação à esta adubação na semeadura. Yano; Takahashi e Watanabe (2005), reportaram que a aplicação tardia de nitrogênio realizada no emborrachamento de trigo propiciou uma maior produção de proteínas nos grãos em relação à aplicação de nitrogênio realizada no perfilhamento e no plantio. Silva *et al.* (2001) observaram que o teor de proteínas não foi afetado pela adubação nitrogenada aplicada no perfilhamento e emborrachamento das plantas de aveia-preta, sob doses de N de 0, 20, 40 e 60 kg ha⁻¹.

O maior efeito gerado pela adubação com nitrogênio em cobertura nos teores de proteína dos grãos, em comparação à adubação na semeadura, pode ser explicado que no período no qual normalmente é feita a aplicação de nitrogênio na cobertura, ou seja, a partir do estágio de quatro a seis folhas expandidas, os entrenós começam a alongar rapidamente, a planta desenvolve-se em taxas muito elevadas e a diferenciação do primórdio da espiga ocorre quando ela está com dez a doze folhas expandidas. Desta forma, é de extrema importância a disponibilidade adequada de nitrogênio neste período (FORNASIERI FILHO, 2007), refletindo mais intensivamente na composição centesimal do grão de milho, do que o nitrogênio fornecido na semeadura, mesmo sabendo-se da importância deste último na constituição de proteínas, enzimas, coenzimas, ácidos nucleicos, etc. (SCHRODER *et al.*, 2000). Esse fato também pode explicar a razão pela qual as variações de nitrogênio na semeadura não terem refletido em diferenças significativas no teor de proteína dos grãos, uma vez que a adubação de cobertura realizada no presente estudo foi a mesma em todos os tratamentos (80 kg ha⁻¹ de N). Malavolta e Dantas (1987) recomendam que o nitrogênio deve ser aplicado em pequena proporção na semeadura e a maior parte em cobertura, no período de maior necessidade, de modo a permitir que o lixiviado pela água da chuva permaneça na área de atuação do sistema radicular.

Com relação ao teor de cinzas, houve variação de 1,53 a 1,67 % (base seca), sendo o nível mais baixo detectado quando se procedeu à adubação na semeadura com 125 Kg ha⁻¹, e o mais alto, na adubação com 250 Kg ha⁻¹ de NPK. Os níveis de adubação e a presença/ausência de inoculação com *P. fluorescens*, avaliados isoladamente (Tabela 2), não tiveram efeitos significativos para os níveis médios de tal resposta. No entanto, a interação entre estes fatores demonstrou efeito significativo na porcentagem média de cinzas (Tabela 2), indicando que a adubação com 250 Kg ha⁻¹ de NPK, aliado à inoculação, poderia acarretar aumento nos teores de minerais nos grãos de milho. Este resultado pode ser explicado pela atuação das rizobactérias, as quais colonizam o sistema radicular de plantas e promovem o seu crescimento, permitindo assim, às plantas terem maior capacidade de absorção dos nutrientes (AGRA, 2007). O fato pode ser mais evidenciado pela correlação positiva significativa ($p=0,57$; $p=0,00$) entre o teor de cinzas e proteína dos grãos de milho (Tabela 3), havendo assim, a tendência de aumento também dos teores de proteína com o aumento das doses de adubação aliado ao uso de rizobactérias. Segundo Ferreira *et al.* (2001), a disponibilidade de minerais no solo influencia a composição mineral foliar e esta, por sua vez, a composição mineral dos grãos de milho.

Os grãos de milho do presente estudo apresentaram contaminação natural por *Fusarium* spp. ($2,0 \times 10^3$ a $2,1 \times 10^6$ UFC g⁻¹), *Penicillium* spp. (não detectável a $1,0 \times 10^5$ UFC g⁻¹), *Aspergillus* spp. (não detectável a $2,0 \times 10^4$ UFC g⁻¹) e leveduras (não detectável a $9,0 \times 10^4$ UFC g⁻¹). Contaminação inicial por *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. também foi relatada por Moreno *et al.* (2009) e da Silva *et al.* (2008) em milho proveniente das safras de 2003 e 2004 da região Norte do Paraná; e por Richard *et al.* (2007), os quais investigaram a micoflora de milho maduro em silo na França. Estes também foram os gêneros freqüentes encontrados em amostras de milho provenientes de Buenos Aires, Argentina, no período de 2005-2006, nas faixas de 10^4 a 10^6 UFC g⁻¹ (Roigé *et al.*, 2009). Almeida *et al.* (2000) avaliando a contaminação fúngica de três híbridos de milho recém-colhidos em três regiões do Estado de São Paulo, detectaram principalmente os gêneros *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. Em Capão Bonito, São Paulo, foram detectados *F. verticillioides* em 35 %, leveduras (32 %), *Penicillium* spp. (27 %), *Aspergillus flavus* (1 %), *Cephalosporium* spp. (1 %), *Nigrospora* spp. (1 %) e *Mucor* spp. (0,5 %) em amostras de milho em diferentes estágios de maturação provenientes da safra de 1999 (ALMEIDA *et al.*, 2002).

A contaminação média por fumonisinas (FB₁ + FB₂) nos grãos de milho variaram entre 0,30 a 0,54 µg g⁻¹ (Tabela 2). Embora alguns países, incluindo a Suíça e Eslováquia

tenham os seus próprios regulamentos que definem os níveis máximos aceitáveis de fumonisinas em milho (SHEPHARD *et al.*, 2000; LABUDA; TANCINOVA; HUDEC, 2003), não existe ainda uma legislação global para regular estes níveis. O “Mycotoxin Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians” estabelece os níveis máximos tolerados entre 5 e 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ ($\text{FB}_1 + \text{FB}_2 + \text{FB}_3$) em milho destinado à alimentação de equinos, suínos, bovinos e aves (IARC-WHO, 2002). O “Food and Drug Administration” (FDA) estabeleceu os valores totais de $\text{FB}_1 + \text{FB}_2 + \text{FB}_3$ de até 4 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o milho destinado ao consumo humano (AVANTAGGIATO *et al.*, 2002). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, Consulta Pública nº 100/2009) propõe os limites máximos de fumonisinas ($\text{FB}_1 + \text{FB}_2$) de 0,2, 0,4, 1,0 e 2,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ para alimentos infantis a base de milho, outros produtos a base deste cereal, farinha de milho e milho não processado, respectivamente (ANVISA, 2010). Desta forma, o milho avaliado no presente estudo, safra de 2009, apresentou níveis de fumonisinas totais ($\text{FB}_1 + \text{FB}_2$) enquadrados dentro dos limites máximos estabelecidos pelos órgãos nacional e internacional.

A contaminação reduzida de fumonisinas pode ser relativa à fertilidade natural do solo aliada à adubação nitrogenada fornecida, as quais proporcionaram uma adubação balanceada e uma planta equilibrada nutricionalmente, aumentando assim sua resistência. Blandino; Reyneri e Vanara (2008) relataram que o *stress* por falta de nitrogênio aumenta significativamente a contaminação de milho por FB_1 . Paralelamente, os baixos níveis de fumonisinas pode ter sido reflexo também das condições climáticas (restrições hídricas) durante o desenvolvimento da cultura no campo (Figura 1). Pereira *et al.* (2010) observaram que altos níveis de fumonisinas foram obtidos em milho na safra de 2007-2008, onde alta precipitação pluviométrica ocorreu da floração à maturidade, em comparação à safra de 2006-2007. Resultados similares foram reportados por Bush *et al.* (2004), que obtiveram aumento nos níveis de fumonisinas associado com estação chuvosa em Clayton, Carolina do Norte, EUA.

Os níveis de adubação, a presença/ausência de inoculação com *P. fluorescens* e a interação entre estes fatores não se mostraram significativos para a contaminação fúngica e por fumonisinas. Exceção foi encontrada para os resultados de contaminação por leveduras, onde houve efeito significativo negativo da interação entre doses de adubação e inoculação, demonstrando que a adubação com maiores doses de NPK, aliada à utilização da rizobactéria, dificultou a contaminação por parte destes microrganismos. As rizobactérias são conhecidas por colonizar rapidamente a rizosfera e reduzir microrganismos nocivos, bem como fitopatógenos na superfície radicular (RANGAJARAN *et al.*, 2003).

Pereira *et al.* (2010) estudaram o efeito de quatro agentes bacterianos de controle na infecção por *F. verticillioides* e produção de fumonisinas em milho. Os autores constaram que, durante a safra 2006-2007, o número de propágulos viáveis do fungo nos grãos de plantas cujas sementes foram tratadas com suspensão de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Microbacterium oleovorans* (isolado 1 e 2), e *Enterobacter hormaechei*, não diferiram dos valores obtidos de grãos de plantas com contaminação natural, fato similar ao ocorrido no presente estudo. Em se tratando da produção de micotoxinas, os autores observaram que níveis de FB₁ foram menores em grãos cuja semente foi tratada com *B. amyloliquefaciens*, *M. oleovorans* (isolado 1) e *E. hormaechei*, em comparação ao controle (contaminação natural). Porém, os teores de FB₁ foram significativamente maiores nos grãos oriundos de plantas que tiveram as sementes tratadas com suspensão de *M. oleovorans* (isolado 2). No entanto, Pereira; Nesci; Etcheverry (2007) haviam avaliado o efeito do tratamento de semente de milho na safra 2004-2005 com a mesma cepa de *M. oleovorans* (isolado 2) e verificaram diminuição nos níveis de fumonisina, em comparação ao controle (contaminação natural). Os autores justificam tal fato pelas diferenças no tipo de solo e nas condições ambientais.

Khan; Doohan (2009) demonstraram a capacidade de duas cepas de *P. fluorescens* (MKB 158 e MKB 249) e de *P. frederiksbergensis* (MKB 202) na redução da contaminação de grãos de trigo por desoxinivalenol (DON) sob condições de campo. Os autores verificaram diminuição de 12 e 21 % de DON em plantas borrifadas com suspensão de *P. frederiksbergensis* (24 h pré-inoculação do patógeno) e 74-78 % de redução quando utilizou as duas cepas de *P. fluorescens*. No entanto, o tratamento da fusariose da espiga de trigo com *Cryptococcus* sp. e *C. nodaensis* (SATO *et al.*, 1999) reduziu a gravidade da doença causada por *F. graminearum* sob condições de campo, porém estas leveduras não reduziram significativamente os níveis de desoxinivalenol encontrados nos grãos. Em batata, Al-Mughrabi (2010) constatou a eficiência de biocontrole com *P. fluorescens* e *Enterobacter cloacae* na redução de doenças no tubérculo comparado com tratamento controle, i.e., somente inoculado com *F. sambucinum*. A variação de comportamento dos agentes de biocontrole e a sua capacidade de inibição do crescimento fúngico e produção de micotoxinas demonstra que vários fatores interferem nos resultados da inoculação, como solo e fatores climáticos.

Observou-se correlação significativa, porém negativa, entre a contagem de leveduras e *Fusarium* spp. (Tabela 3), indicando haver competição entre estes dois microrganismos. Desta maneira, os resultados demonstram que, simultaneamente à redução da contagem de leveduras com o aumento da dose de adubação e inoculação com *P. fluorescens*, há tendência de haver

condições propícias ao crescimento de *Fusarium* spp. Assim, além de comprometer o desenvolvimento e potencial produtivo da cultura do milho, possivelmente as condições climáticas desfavoráveis (restrições hídricas e geadas, Figura 1) também afetaram a sobrevivência, a estabilidade, a multiplicação e a associação das rizobactérias com a cultura. Hallman e Berg (2006) afirmaram que a comunidade endofítica de determinada planta pode ser afetada por fatores bióticos, como as espécies de plantas em si, genótipo e idade, vias de colonização de microorganismos associados e por fatores abióticos, como condições climáticas.

É necessário dar continuidade aos estudos com *P. fluorescens* na cultura do milho em condições climáticas favoráveis, em que a adubação e a inoculação com *P. fluorescens* possam expressar seus possíveis efeitos sobre o desenvolvimento e nutrição da planta, proteção contra patógenos e, conseqüentemente, sobre a qualidade do grão.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) em associação com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), à Fundação Araucária, ao UGF Fundo Paraná-SETI e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) – Projeto Nanobiotecnologia (04/CII-2008) pelo suporte financeiro.

Referências

AFZAL, A; BANO, A. *Rhizobium* and phosphate solubilizing bacteria improve the yield and phosphorus uptake in wheat (*Triticum aestivum*). **International Journal of Biology**, v.10, p. 85-88, 2008.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 15 junho 2010.

AGRA, A. G. S. de M. **Utilização de rizobactéria de micorrizas na produção de mudas de maracujá**. Dissertação de Mestrado em Agronomia; Produção Vegetal – Universidade federal de Alagoas. Rio Largo, 48 f., 2007.

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

AL-MUGHRABI, K. I. Biological control of *Fusarium* dry rot and other potato tuber diseases using *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter cloacae*. **Biological Control**, v. 53, p. 280–284, 2010.

- ALMEIDA, A. P.; CORRÊA, B.; MALLOZZI, M. A. B.; SAWAZAKI, E.; SOARES, L. M. V. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 321-326, 2000.
- ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 16. ed. AOAC, cap. 49, p. 35-36, 1995.
- AVANTAGGIATO, G.; QUARANTA, F.; DESIDERIO, E.; VISCONTI, A. Fumonisin contamination of maize hybrids visibly damaged by *Sesamia*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 13-18, 2002.
- BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F. Influence of nitrogen fertilization on mycotoxin contamination of maize kernels. **Crop Protection**, v. 27, p. 222-230, 2008.
- BLOEMBERG, G.V., LUGTENBERG, B.J.J. Molecular basis of plant growth promotion and biological control by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 343-350, 2001.
- BUSH, B.J.; CARSON, M. L.; CUBETA, M. A.; HAGLER, W. M.; PAYNE, G. A. Infection and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* in developing maize kernels. **Phytopathology**, v. 94, n. 1, p. 88-93, 2004.
- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Safras de grãos: Brasil/produtores**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em 11 março 2010.
- da SILVA, M.; GARCIA, G. T.; VIZONI, É.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Effect of the time interval from harvesting to the pre-drying step on natural fumonisin contamination in freshly harvested corn from the State of Paraná, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 5, p. 642-649, 2008.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999. 412p.
- EMBRAPA. **Nutrição e Adubação do Milho**. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/feraduba.htm>>. Acesso em 15 fevereiro 2009.
- FERREIRA, A. C. B.; ARAÚJO, G. A. A.; PEREIRA, P. R. G.; CARDOSO, A. A. Características agrônômicas e nutricionais do milho adubado com nitrogênio, molibdênio e zinco. **Scientia Agricola**, v.58, n.1, p.131-138, 2001.
- FORNASIÈRE FILHO, D. **Manual da cultura do milho**. São Paulo: FUNEP, 2007.
- 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, 1407-1411, 1990.
- GALLO, J. R.; TEIXEIRA, J. P. F.; SPOLADORE, D. S.; IGUE, T.; DE MIRANDA, L. T. Influência da adubação nas relações entre constituintes químicos dos grãos, dos grãos e das folhas, e a produção de milho. **Bragantia**, Revista Científica do Instituto Agronômico do Estado de São Paulo, v. 35, n. 36, p. 413-432, 1976.
- GELDERBLOM, W.C.A.; KRIEK, N.P.J.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁ in rats, **Carcinogenesis**, v. 12, p. 1247-1251, 1992.
- GELINEAU-VAN WAES J, VOSS KA, STEVENS VL, SPEER MC, RILEY RT. Maternal fumonisin exposure as a risk factor for neural tube defects. **Advances Food Nutrition Research**, v. 56, p. 145-181, 2009.

GENTER, O. F.; EHEART, J. F.; LINKOUS, W. N. Effects of location, hybrid, fertiliser, and rate of planting of the oil and protein contents of corn grain. **Agronomy Journal**, v. 48, p. :63-67, 1956.

GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by freeliving bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 109–117, 1995.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, A.; HEYDRICH-PÉREZ, M.; ACEBO-GUERRERO, Y.; VELAZQUEZ-DEL VALLE, M. G.; HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A. N. Antagonistic activity of Cuban native rhizobacteria against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. in maize (*Zea mays* L.). **Applied Soil Ecology**, v. 39, p 180-186, 2008.

IAPAR. **Monitoramento Agroclimático do Paraná**. Disponível em: <<http://200.201.27.14/Site/Sma/Index.html>>. Acesso em: 20 abril 2010.

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

International Agency for Research on Cancer – World Health Organization (IARC-WHO). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and atyrene. In **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human**, vol. 82, pp. 301, 2002. Lyon: IARC Working Group, World Health Organization.

KANAMPIU, F. K; FRIESEN, D.; GRESSEL, J. CIMMYT collaborative efforts unveil herbicide-coated maize seed technology to curb problematic *Striga*. **Integrated Pest Management Reviews**, v. 7, n. 1, p. 63-64, 2002.

KHAN, M.R., DOOHAN, F.M. Bacterium-mediated control of *Fusarium* head blight disease of wheat and barley and associated mycotoxin contamination of grain. **Biological Control**, v. 48, p. 42–47, 2009.

LABUDA, R.; TANCINOVA, D.; HUDEC, K. Identification and enumeration of *Fusarium* species in poultry feed mixtures from Slovakia. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 10, p. 61-66, 2003.

LATOURE, X.; LEMANCEAU, P. Carbon and energy metabolism of oxidasepositive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp. **Agronomie**, v. 17, p. 427-443, 1997.

LI, F. Q.; YOSHIZAW, 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.

MALAVOLTA, E.; DANTAS, J. P. Nutrição e adubação do milho. In: PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G. P. **Melhoramento e produção do milho**. 2 ed., Campinas: Fundação Cargill, 795 p, 1987.

MARASAS, W. F. O.; NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A. (Eds.), **Toxigenic *Fusarium* Species**, The Pennsylvania State Univ. Press, University Park, 1984.

MARASAS, W. F. O.; KELLERMAN, T. S.; GELDERBLUM, W. C. A.; THIEL, P. G.; COETZER, J. A. W. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁, isolated from *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 197 – 203, 1988.

MARASAS, W. F. O. Fumonisin: Their implications for human and animal health. **Natural Toxins**, v. 3, p. 193–198, 1995.

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

- MORENO, E. C.; GARCIA, G. T.; ONO, M. A.; VIZONI, E.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. **Food Chemistry**, v. 116, p. 220-226, 2009.
- MYOUNGSU, P.; CHUNGWOO, K.; JINCHUL, Y.; HYOUNGSEOK, L.; WANSIK, S.; SEUNGHWAN, K.; TONGMIN, S. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. **Research in Microbiology**, v. 160, p. 127-133, 2005.
- 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, 1983.
- NORRED, W. P. Fumonisin-mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*, **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 38, p. 309-328, 1993.
- OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA S.; BALDANI, J. I. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, 2003. 40 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161).
- PEREIRA, P.; NESCI, A.; ETCHEVERRY, M. Effects of biocontrol agents on *Fusarium verticillioides* count and fumonisin content in the maize agroecosystem: Impact on rhizospheric bacterial and fungal groups. **Biological Control**, v. 42, p. 281-287, 2007.
- PEREIRA, P.; NESCI, A.; CASTILLO, C.; ETCHEVERRY, M. Impact of bacterial biological control agents on fumonisin B₁ content and *Fusarium verticillioides* infection of field-grown maize. **Biological Control**, v. 53, p. 258-266, 2010.
- PIONEER SEMENTES[®]. Disponível em <<http://www.pioneersementes.com.br/>>. Acesso em: 12 março 2010.
- POMMER, C. V.; SAWAZAKI, E. Influência da adubação mineral continua na produção de proteína e no seu teor percentual nos grãos de milho. **Bragantia**, Campinas, v. 40, n. 9, 1981.
- RAIJ, B.V.; QUAGGIO, A.J. **Métodos de análise de solo para fins de fertilidade**. Campinas : Instituto Agrônômico, 1983. 31p.
- RANGAJARAN, S.; SALEENA, L.M.; VASUDEVAN, P.; NAIR, S. Biological suppression of rice diseases by *Pseudomonas* spp under saline soil conditions. **Plant Soil**, v. 251, p. 73-82, 2003.
- REID, L. M.; ZHU, X.; MA, B. L. Crop rotation and nitrogen effects on maize susceptibility to Gibberella (*Fusarium graminearum*) ear rot. **Plant and Soil**, v. 237, p. 1-14, 2001.
- RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; VISMER, H.F. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2101-2105, 2002.
- RICHARD, E.; HEUTTE, N.; SAGE, L.; POTTIER, D.; BOUCHARTE, P.; LEBAILLY, P.; GARON, D. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2420-2425, 2007.
- RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J.; BENSON, G.O. How a Corn Plant Develops. Special Report no 48, Ames: **Iowa State University of Science and Technology**, 1986. 21p. (Special Reporter, 48)
- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 319-339, 1999.

- ROIGÉ, M. B.; ARANGUREN, S. M.; RICCIO, M. B.; PEREYRA, S.; SORACI, A. L.; TAPIA, M. O. Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 45, p. 233-237, 2009.
- ROSS, P. F.; NELSON, P. E.; RICHARD, J. L.; OSWEILER, G. D.; RICE, L. G.; PLATTNER, R. D.; WILSON, T. M. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolated associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3225–3226, 1990.
- SAMSON, R.A.; HOESKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C. **Introduction to food-borne fungi**. 4 ed. The Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995.
- SATO, I.; KOBAYASHI, H.; HANYA, Y.; MURAKAMI, S.; SCORZETTI, G.; FELL, J.W. *Cryptococcus nodaensis* sp. nov., a yeast isolated from soil in Japan that produces a salt-tolerant and thermostable glutaminase. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 127–132, 1999.
- SCHRODER, J. J.; NEETESON, J.J.; OENEMA, O.; STRUIK, P.C. Does the crop or the soil indicate how to save nitrogen in maize production? Reviewing the state of art. **Fields Crop Research**, v. 66, n. 1, p. 151-164, 2000.
- SHEPHARD, G. S.; SYDENHAM, E. W.; THIEL, P. G.; GELDERBLOM, W. C. A. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v.13, p.2077-2087, 1990.
- SHEPHARD, G. S.; MARASAS, W. F.; LEGGOT, N. L.; YAZDANPANA, H.; RAHIMIAN, H.; SAFAVI, N. Natural occurrence of fumonisins in corn from Iran. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 1860–1864, 2000.
- SILVA, R. H.; ZUCARELI, C.; NAKAGAWA, J.; SILVA, R. A.; CAVARIANI, C. Doses e épocas de aplicação do nitrogênio na produção e qualidade de sementes de aveia-preta. **Revista Brasileira de Sementes**, v 23, n. 2, p.51-55, 2001
- SHIM, W.B.; WOLOSHUK, C.P. Nitrogen repression of fumonisin B₁ biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. **Fems Microbiology Letters**, v. 177, p. 109 - 116, 1999.
- SYDENHAM, E. W.; MARASAS, W. F. O.; SHEPHARD, 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, 1992.
- 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.
- VITTI, G. C.; WIT, A.; FERNANDES, B. E. P. Eficiência agrônômica dos termofosfatos e fosfatos reativos naturais. In: **Simpósio sobre fósforo na agricultura brasileira**, v. 1, Piracicaba, p. 690-694, 2004.
- WHIPPS, J. M. Developments in the biological control of soilborne plant pathogens. In: CALLOW, J.A. (Ed.). **Advances in botanical research**. Birmingham: Academic, v.26, p.1-84, 1997.
- WIDSTROM, N. W. The aflatoxin problem with corn grain, 1996. In: BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F. Influence of nitrogen fertilization on mycotoxin contamination of maize kernels. **Crop Protection**, v. 27, p. 222 – 230, 2008.

YANO, G. T.; TAKAHASHI, H. W.; WATANABE, T. S. Avaliação de fontes de nitrogênio e épocas de aplicação em cobertura para o cultivo do trigo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 2, p. 141-148, 2005.

Tabela 1 - Caracterização química do solo da área experimental na profundidade de 0-10 e 0-20 cm

Prof. cm	pH		H + Al	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	CTC	V %	P mg dm ⁻³
	CaCl ₂	H ₂ O							
0-10	5,3	6,0	4,2	5,7	1,5	0,9	12,3	66,27	10,51
10-20	5,1	5,7	4,9	4,6	1,2	0,4	11,1	55,53	6,46

Prof. (cm)	Mn	Fe	Cu	Zn	B
0-10	224,2	64,99	17,40	12,26	0,66
10-20	214,5	73,69	17,22	2,92	0,84

* Extratores: Ca, Mg, Al: KCl; P, K: Mehlich-I; Mn, Fe, Cu, Zn: Mehlich-I; B: HCl 0,05 N

Tabela 2 - Teores de proteína e cinzas, contaminação fúngica e de fumonisinas de grãos de milho provenientes de cultivo sob diferentes níveis de adubação NPK e inoculação das sementes com *Pseudomonas fluorescens*, Londrina-PR, 2009

Causas de variação	Variáveis analisadas							
	Proteína (%)	Cinzas (%)	FB ₁ (µg g ⁻¹)	FB ₂ (µg g ⁻¹)	<i>Fusarium</i> spp. (log UFC g ⁻¹)	<i>Penicillium</i> spp. (log UFC g ⁻¹)	<i>Aspergillus</i> spp. (log UFC g ⁻¹)	Leveduras (log UFC g ⁻¹)
Adubação (Kg ha⁻¹)								
0	11,74±1,29 ^a	1,60±0,27 ^a	0,26±0,26 ^a	0,12±0,17 ^a	4,88±0,38 ^a	1,59±2,19 ^a	0,50±1,41 ^a	1,20±2,23 ^a
125	11,42±0,98 ^a	1,53±0,13 ^a	0,34±0,45 ^a	0,20±0,35 ^a	5,18±0,67 ^a	1,03±1,97 ^a	0,37±1,06 ^a	0,61±1,75 ^a
250	11,52±1,18 ^a	1,67±0,16 ^a	0,23±0,27 ^a	0,10±0,13 ^a	5,10±0,94 ^a	1,53±2,14 ^a	0,53±1,52 ^a	0,68±1,93 ^a
Inoculação								
Sem	11,32±0,94 ^a	1,59±0,24 ^a	0,20±0,20 ^a	0,10±0,14 ^a	4,92±0,71 ^a	1,66±2,10 ^a	0,25±0,86 ^a	0,45±1,57 ^a
Com	11,80±1,26 ^a	1,62±0,15 ^a	0,35±0,41 ^a	0,18±0,30 ^a	5,19±0,65 ^a	1,10±2,00 ^a	0,69±1,61 ^a	1,21±2,20 ^a
Valor de F								
Adubação (A)	0,14 ns	0,59 ns	0,03 ns	0,02 ns	0,36 ns	0,00 ns	0,00 ns	0,33 ns
Inoculação (I)	1,06 ns	0,13 ns	1,37 ns	0,68 ns	0,86 ns	0,41 ns	0,63 ns	1,06 ns
A * I	1,60 ns	5,13*	2,44 ns	1,57 ns	0,50 ns	0,67 ns	0,00 ns	4,36*

* Média oriundas de 4 repetições ± desvio padrão seguida pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

^{ns} Não significativo, *significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 3 - Resultados de correlação simples entre diferentes níveis de adubação NPK, inoculação com *Pseudomonas fluorescens*, teores de proteína/cinzas, contaminação fúngica e por fumonisinas em grãos de milho

Variáveis	Dose de adubação	Inoculação	Proteína	Cinzas	Fumonisinas		<i>Fusarium spp.</i>	<i>Penicillium spp.</i>	<i>Aspergillus spp.</i>	Leveduras
					FB ₁	FB ₂				
Doses de adubação	$\rho=1,00$ p=---	$\rho=0,00$ p=1,00	$\rho=-0,08$ p=0,70	$\rho=0,15$ p=0,48	$\rho=-0,03$ p=0,86	$\rho=-0,03$ p=0,86	$\rho=0,12$ p=0,54	$\rho=-0,01$ p=0,95	$\rho=0,01$ p=0,95	$\rho=-0,11$ p=0,59
Inoculação		$\rho=1,00$ p=---	$\rho=0,21$ p=0,31	$\rho=0,07$ p=0,74	$\rho=0,24$ p=0,25	$\rho=0,17$ p=0,41	$\rho=0,19$ p=0,35	$\rho=-0,14$ p=0,51	$\rho=0,17$ p=0,41	$\rho=0,20$ p=0,34
Proteína			$\rho=1,00$ p=---	$\rho=0,57^*$ $\rho=0,00$	$\rho=0,16$ p=0,43	$\rho=0,18$ p=0,39	$\rho=0,31$ p=0,12	$\rho=0,18$ p=0,39	$\rho=-0,36$ p=0,07	$\rho=0,00$ p=1,00
Cinzas				$\rho=1,00$ p=---	$\rho=0,16$ p=0,44	$\rho=0,15$ p=0,45	$\rho=0,15$ p=0,47	$\rho=-0,00$ p=0,99	$\rho=-0,11$ p=0,59	$\rho=0,01$ p=0,95
FB₁					$\rho=1,00$ p=---	$\rho=0,94^*$ $\rho=0,00$	$\rho=-0,11$ p=0,58	$\rho=-0,37$ p=0,07	$\rho=0,16$ p=0,44	$\rho=0,14$ p=0,51
FB₂						$\rho=1,00$ p=---	$\rho=-0,22$ p=0,28	$\rho=-0,31$ p=0,13	$\rho=0,03$ p=0,85	$\rho=0,27$ p=0,19
<i>Fusarium spp.</i>							$\rho=1,00$ p=---	$\rho=0,11$ p=0,59	$\rho=0,06$ p=0,76	$\rho=-0,40^*$ $\rho=0,04$
<i>Penicillium spp.</i>								$\rho=1,00$ p=---	$\rho=0,02$ p=0,90	$\rho=0,39$ p=0,05
<i>Aspergillus spp.</i>									$\rho=1,00$ p=---	$\rho=0,15$ p=0,46
Leveduras										$\rho=1,00$ p=---

*Correlações significativas a $p < 0,05$, ρ = correlações, p = nível de significância.

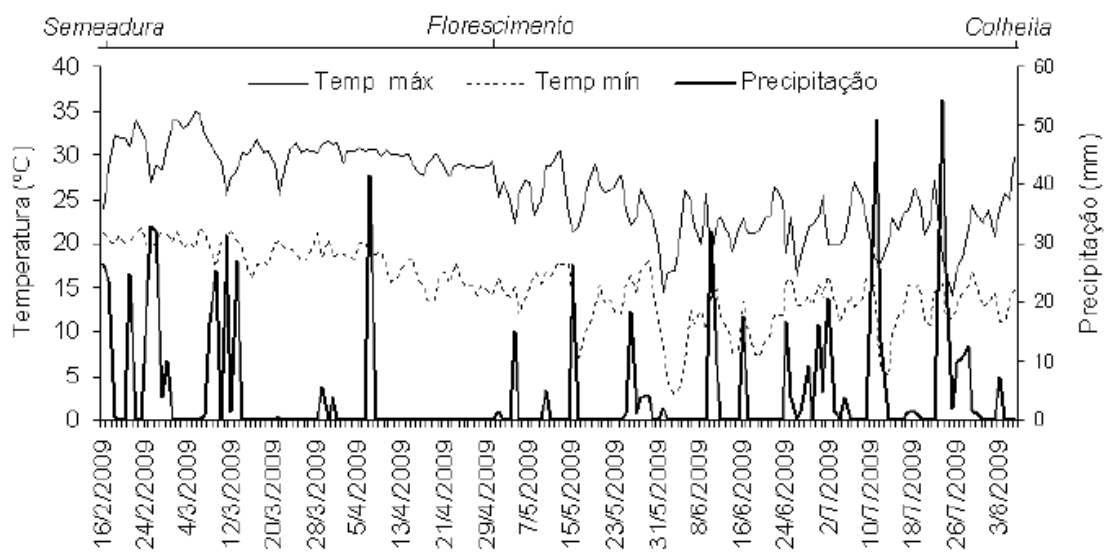


Figura 1. Dados diários de temperaturas máximas e mínimas e de precipitação pluviométrica durante o período de condução do experimento em Londrina-PR.

6 CONCLUSÃO

Choque térmico aplicado no início da incubação (2° dia) foi ineficaz na alteração da produção de fumonisinas pela cepa 103F. No entanto, um aumento foi observado quando choque térmico de 40 °C foi aplicado após duas semanas de incubação sob condição ótima (25 % de umidade dos grãos e 20 °C/ 20 dias) para produção desta toxina observada após validação matemática/estatística e gráfica de modelos matemáticos.

No decorrer de anos de repicagem-estocagem (1991 a 2007), cepas de *F. verticillioides* (103F, 113F, 119B, 119BR e 97K) isoladas de rações envolvidas em surtos de intoxicação animal no ano de 1991 no Estado do Paraná, mantiveram produção de fumonisinas em níveis detectáveis, sendo que 90 % das cepas avaliadas produziram FB₁ (0,28 a 2610,6 µg g⁻¹) e 85 %, FB₂ (0,03 a 781,1 µg g⁻¹); porém duas cepas perderam a capacidade de produção desta toxina. No entanto, houve decréscimo na toxigenicidade destas cepas, sugerindo o efeito de repicagens aliado à estocagem na expressão de enzimas envolvidas na biossíntese de metabólitos secundários, indicando a necessidade de avaliar as características das culturas antes de proceder qualquer ensaio experimental toxicológico.

Composição do meio de cultura e as cepas de *F. verticillioides* com diferentes datas de repique (2007 e 2008) não apresentaram influência significativa no crescimento fúngico e na produção de fumonisinas. No entanto, o tratamento térmico (121 °C/20 min) resultou na eliminação aparente da microbiota natural presente nos grãos de milho e sua aplicação foi suficiente para prover aumentos significativos na produção de fumonisinas e no crescimento fúngico. No híbrido Tork observou-se maior produção de fumonisina B₁ e total (FB₁+FB₂) e contagem de leveduras, em comparação ao híbrido P30F53.

Modelos matemáticos desenvolvidos demonstraram que o conteúdo de umidade dos grãos teve maior efeito no crescimento fúngico, sendo que maiores contagens de *F. verticillioides* ocorreram em 27-30 % de umidade, sob 27-30 °C e 15-22,5 °C para os híbridos P30F53 e Tork, respectivamente. Já a temperatura foi a variável que exerceu maior influência na produção de fumonisinas, obtendo-se maiores níveis em ambos híbridos com 22,5 % de umidade, sob 22,5 °C e 10⁵ propágulos de *F. verticillioides* mL⁻¹.

Condições de incubação sob 18 % e 15 % de umidade, 27 °C e 22,5 °C, 10⁴ e 10⁵ propágulos mL⁻¹ ocasionaram baixos níveis de fumonisina e nenhum aumento significativo da

contagem de *F. verticillioides* após fase lag, durante 20 dias de incubação. Houve redução dos níveis de proteína e lipídeos no início da fase lag, sendo que o último teve redução também no início da fase log, com elevação dos níveis durante fase estacionária.

Sob condições de campo, a contaminação por fumonisinas não teve correlação significativa com a dose de nitrogênio em cobertura e com a densidade de plantas. Foram observados maiores teores de proteína e lipídeos e menores níveis de amido nos grãos com o aumento das doses de nitrogênio. A densidade populacional teve correlação significativa negativa com os teores de cinzas e lipídeos, e maiores teores de amido foram detectados com incremento da população de plantas.

Os diferentes níveis de adubação NPK, a presença e ausência de inoculação com *P. fluorescens* e a interação entre estes fatores não se mostraram significativos para a porcentagem de proteína e fumonisinas em grãos de milho. No entanto, adubação com 250 Kg ha⁻¹ de NPK, aliado à inoculação com a rizobactéria, proporcionou aumento nos teores de minerais nos grãos de milho. O mesmo tratamento indicou inibição do crescimento de leveduras, porém a correlação significativa negativa entre estas e *Fusarium* spp., demonstrou que mesmo com a inoculação com *P. fluorescens*, este gênero teve condições de crescimento.

O conhecimento do efeito de fatores bióticos e abióticos e de pontos críticos para crescimento de *F. verticillioides* e produção de fumonisinas, mediante utilização de modelos matemáticos, aliado a práticas de manejo e uso de biocontrole, representam estratégias para minimizar o risco de contaminação na cadeia produtiva de milho.

7 PUBLICAÇÃO E TRABALHOS CIENTÍFICOS

Os resultados obtidos no transcurso da pesquisa foram apresentados em eventos, visando publicação na forma de artigo científico, revisão, capítulo de livro, conforme listados abaixo:

Artigos publicados em periódicos

BERND, L. P., SOUZA, T. M., ISHIKAWA, A. T., ONO, E. Y. S., GERAGE, A. C., FURLONG, E. B., HIROOKA, E. Y.

Estudo Preliminar visando modelagem matemática para análise do efeito de microbiota e variedade de milho no crescimento e produção de fumonisinas de *Fusarium verticillioides*. **Tropical Plant Pathology**, v.34, p.S232, 2009.

BERND, L. P., SOUZA, T. M., SOBOTTKA, R. P., ISHIKAWA, A. T., HIROOKA, E. Y. Dinâmica da produção de fumonisina e crescimento de *Fusarium verticillioides* em grãos de milho. **Revista Ciências da Vida**, v.28, p.89 - 91, 2008.

BERND, L. P., CURIONI, A., SOUZA, T. M., SOBOTTKA, R. P., GERAGE, A. C., MARSARO JR., A., ONO, E. Y. S., HIROOKA, E. Y.

Modelagem do efeito de umidade e temperatura no crescimento de *Fusarium verticillioides* e perda de qualidade em milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.S143, 2007.

Resumos Publicados em Anais de Congressos

BERND, L. P., SOUZA, T. M., SOBOTTKA, R. P., ISHIKAWA, A. T., HIROOKA, E. Y. Crescimento de *Fusarium verticillioides*, Produção de Fumonisinas e Interação Microbiana na Cadeia Produtiva de Milho In: **XXVII Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, 2008, Londrina.

BERND, L. P., ONO, E. Y. S., HOMECHIN, M., FUJII, S., SCHIABEL, V. C., SAMAPUNDO, S., MARSARO JR., A., GERAGE, A. C., GARCIA, G. T., OLIVEIRA, T. C. R. M., SABINO, M., MIZUBUTI, I. Y., ITANO, E. N., KAWAMURA, O., HIROOKA, E. Y.

Approach in predictive modelling of *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin production in freshly post-harvest corn. In: **XIIth International IUPAC - Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**, 2007, Istanbul, Turquia.

Resumos Expandidos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos

ISHIKAWA, A. T., SOBOTTKA, R. P., BERND, L. P., SOUZA, T. M., PEDROLLO, D., ONO, E. Y. S., HIROOKA, E. Y.

Modelagem Preditiva do Crescimento de *Fusarium verticillioides* e produção de fumonisinas em grãos de milho In: **XVII Encontro Anual de Iniciação Científica**, 2008, Foz do Iguaçu, PR.

MONTAGNER, T., BERND, L. P., ISHIKAWA, A. T., PEDROLLO, D., ONO, E. Y. S., HIROOKA, E. Y. Influencia de fatores no crescimento de *Fusarium verticillioides* e produção de fumonisinas em grãos milho. In: **XVIII EAIC**, 2009, Londrina, PR.

8 REFERÊNCIAS

- ABADO-BECOGNEÉ, K.; MOBIO, T.A.; ENNAMANY, R.; FLEURAT – LESSARD, F.; SHIER, W.T.; BADRIA, F.; CREPPY, E.E. Cytotoxicity of Fumonisin B₁: Implication of Lipid Peroxidation and Inhibition of Protein and DNA Synthesis. **Archives of Toxicology**, v. 72, p. 233 - 236, 1998.
- ABBAS, H.T.; OCAMB, C.M. First report of fumonisin B₁ *Fusarium polyphialidicum* collected from seeds of *Pinus strobes*. **Plant Disease**, v.79, p.642-645, 1995.
- ABIMILHO- Associação Brasileira das Indústrias Moageiras de Milho. Disponível em: < <http://www.abimilho.com.br>>. Acesso em: 13 março 2010.
- AFZAL, A; BANO, A. *Rhizobium* and phosphate solubilizing bactéria improve the yild and phosphorus uptake in wheat (*Triticum aestivum*). **International Journal of Biology**, v.10, p. 85-88, 2008.
- AGRA, A. G. S. de M. **Utilização de rizobactéria de micorrizas na produção de mudas de maracujá**. Dissertação de Mestrado em Agronomia; Produção Vegetal – Univerdidade federal de Alagoas. Rio Largo, 48 f., 2007.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. New York. Academic Press. 1988.
- 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 B₁ by *Fusarium moniliforme*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1729-1733, 1990.
- ALMEIDA, M. L.; SANGOI, L. Aumento da densidade de plantas de milho para regiões de curta estação estival de crescimento. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 2, n. 2, p. 179-183, 1996.
- AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH AB. **Reverse Phase Cromatography: Principles and Methods**, Sweden, 1999.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 15 junho 2010.
- ARAÚJO, L.A.N.; FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C.P. Adubação nitrogenada na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 8, p. 771-777, 2004.
- AVANTAGGIATO, G.; QUARANTA, F., DESIDERIO, E. AND VISCONTI, A. 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 B₁, B₂ nd B₃ 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 B₁, B₂ and B₃. **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.
- BALARDIN, R. S.; DALLAGNOL, L. J.; DIDONÉ, H. T.; NAVARINI, L. Influência do Fósforo e do Potássio na Severidade da Ferrugem da Soja *Phakopsora pachyrhizi*. **Fitopatologia Brasileira**, v 31, n. 5, p. 63-68, 2006.
- BAPTISTA, A.S.; HORII, J.; BAPTISTA, A.S. Fatores Físico - Químicos e Biológicos Ligados à Produção de Micotoxinas. **B.CEPPA**, v. 22, n. 1, p. 1 – 14, 2004.
- BERND, L.P., CURIONI, A.A., BASSO, F., FURLONG, E.B., ONO, E.Y.S., GERAGE, A.C., HIROOKA, E.Y. Modelagem matemática para fumonisinas em milho e perfil cromatográfico de metabólitos produzidos por *Fusarium verticillioides*. *Semina: Ciências Agrárias*, 29: 361-378, 2008.
- BETIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1991.
- BEVIVINO, A.; PEGGION, V.; CHIARINI, L.; TABACCHIONI, S.; CANTALE, C.; DALMASTRI, C. Effect of *Fusarium verticillioides* on maize-root-associated *Burkholderia cenocepacia* populations. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 974–983, 2005.
- BEZUIDENHOUT, S. C.; GELDERBLUM, W. C. A.; GORST-ALLMAN, C. P.; HORAK, R. M.; MARASAS, W. F. O., SPITELLER, G.; VLEGGAAR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society – Chemical Communications**, v. 19, p. 743–745, 1988.
- BLACKWELL, B.A.; EDWARDS, O.E.; FRUCHIER, A.; APSIMON, J.W.; MILLER, J.D. NMR Structural Studies of Fumonisin B₁ and related compounds from *Fusarium moniliforme*. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 392, p. 75 – 91, 1996.
- BLANDINO, M.; ALMA, A.; MATTA, A.; REYNERY, A. Best Management Practices to Assure Low Mycotoxin Content of Corn Kernel During Production. **International Quality Grains Conference Proceedings**, Indianapolis, Indiana, USA, 2004.
- BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F. Influence of Nitrogen Fertilization on Mycotoxin Contamination of Maize Kernels. **Crop Protection**, v. 27, p. 222 – 230, 2008.
- BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B.J.J. Molecular basis of plant growth promotion and biological control by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 343–350, 2001.
- BOJJA, R.S.; CERNY, R.L.; PROCTOR, R.H.; LIANGCHENG, D. Determining the Biosynthetic Sequence in the Early Steps of the Fumonisin Pathway by Use of Three Gene – Disruption Mutants of *Fusarium verticillioides*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2855 – 2860, 2004.

- BOLGER, M., COKER, R.D., DINOVI, M., GAYLOR, D., GELDERBLUM, W., & OLSEN, M., et al. In **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**, pp. 103–280. Edited by the Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). FAO, Rome, 2001.
- BRANHAM, B.E.; PLATTNER, R.D. Alanine is a Precursor in the Biosynthesis of Fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**, v.124, p. 99 – 104, 1993.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Comissão Nacional de Sementes e Mudas**. Brasília, 318p., 1989.
- BRESSAN, W. Biological control of maize seed pathogenic fungi by use of actinomycetes. **BioControl**, v. 48, p. 233–240, 2003.
- BUCCI, T. J.; HANSEN, D. K.; LABORDE, J. B. Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin fumonisin B₁. **Natural Toxins**, v. 4, p. 51–52, 1996.
- BULL, L.T. **Nutrição mineral do milho**. In: BULL, L.T.; CANTARELLA, H. Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: POFAFOS, p. 63-145, 1993.
- CAHAGNIER, B.; MELCION, D.; RICHARD-MOLARD, D. Growth of *Fusarium moniliforme* and biosynthesis of fumonisin B₁ on maize grain as a function of different water activities. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 217-251, 1995.
- CALDAS, E.D.; SADILKOVA, K.; WARD, B.L.; JONES, A.D.; WINTER, C.K.; GILCHRIST, D.G. Biosynthetic Studies of Fumonisin B₁ and AAL Toxins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4734 – 4743, 1998.
- CANTARELLA, H.; DUARTE, A.P. Manejo da fertilidade do solo para a cultura do milho. In: GALVÃO, J.C.C.; MIRANDA, G.V., eds. **Tecnologia de produção de milho**. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, p.139-182, 2004.
- CARMO, C. A. F. S.; MENEGUELLI, N. A.; MACEDO, J. R.; CAPECHE, C. L.; MELO, A. S.; SILVA, E. F. Acúmulo de nutrientes em milho cultivado em Nitossolo degradado sob diferentes fontes de adubação. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 15, n. 2, 2003.
- CARMONA, G.; CHRISTIANSON, C.B.; BYRNES, B.H. Temperature and low concentration effects of the urease inhibitor N-(n-butyl)thiophosphoric triamide (nBTPT) on ammonia volatilization from urea. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 22, n. 7, p. 933-937, 1990.
- CASA, R. T.; REIS, E. M. Doenças na cultura do milho. In: **Milho: estratégias de manejo para alta produtividade**. Piracicaba: ESALQ/USP, v.4, p.1-18, 2003.
- CASTELO, M. M.; SUMNER, S. S.; BULLERMAN, L. B. Stability of fumonisins in thermally processed corn products. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 1030–1033, 1998.
- CAVAGLIERI, L., ORLANDO, J., ETCHEVERRY, M., In vitro influence of bacterial mixtures on *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B₁ production: effect of seeds treatment on maize root colonization. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p. 390–396., 2005.
- CAVAGLIERI, L.R.; PASSONE, A.; ETCHEVERRY, M.G. Correlation between screening procedures to select root endophytes for biological control of *Fusarium verticillioides* in *Zea mays* L. **Brazilian Journal of Biology**, v. 31, p. 259-267, 2004.

- 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 fomonisin B₁ 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.
- CIMMYT- **Internacional Maize and Wheat Improvement Center**. Disponível em: <http://www.cimmyt.org/english/wpp/afr_liveli/index.cfm>. Acesso em: 25 novembro 2009.
- CIOLA, R. **Fundamentos de cromatografia a líquido de alto desempenho**. Ed. Edgard Blücher Ltda, 1998.
- COELHO, L. F.; FREITAS, S. S.; MELO, A. M. T.; AMBROSANO, G. M. B. Interação de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e de *Bacillus* spp. com a rizosfera de diferentes plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.1413-1420, 2007.
- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Safras de grãos: Brasil/produtores**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em 11 de Março de 2010.
- 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.
- DEVELASH, R.K. & SUGHA, S.K. Factors affecting development of downy mildew (*Peronospora destructor*) of onion (*Allium cepa*). **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 67, p. 71-74, 1997.
- 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.
- DOURADO NETO, D.; PALHARES, M.; VIEIRA, P.A.; MANFRON, P.A.; MEDEIROS, S.L.P.; ROMANO, M.R. efeito da população de plantas e do espaçamento sobre a produtividade de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 2, n. 3, p.63-77, 2003
- DUARTE, J.O.; CRUZ, J.C.; GARCIA, J.C.; MATTOSO, M.J: **Cultivo do Milho**. EMBRAPA Milho e Sorgo – Sistema de Produção 1, versão eletrônica – 2ª edição [Internet], 2006. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>.
- DUVICK, J. Prospects for reducing fumonisin contamination of maize through genetic modification. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 2, p. 337-342, 2001.
- EMBRAPA. **Nutrição e Adubação do Milho**. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/feraduba.htm>>. Acesso em 10 fevereiro 2010.
- FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Introdução In: **Produção de milho**. 1. ed. Rio Grande do Sul: Agropecuária, cap.1, p. 21, 2000.
- FANDOHAN, P.; HELL, K.; MARASAS, W. F. O.; *et al.* Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in Africa. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 12, p. 570-579, 2003.
- FIGUEIRA, E.L.Z.; BLANCO-LABRA, A.; GERAGE, A.C.; ONO, E.Y.S.; MENDIOLA-OLAYA, 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.
- FORNASIERE FILHO, D. **Manual da cultura do milho**. São Paulo: FUNEP, 2007.
- 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.
- FREITAS, S. S.; AGUILAR VILDOSO, C. I. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, n. 6, p.987-994, 2004.
- FREITAS, L. G. **Rizobactérias versus nematóides**. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/lab/nematologia/rizo.pdf>>. Acesso em: Abril. 2008.
- 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.
- GALLO, J. R.; TEIXEIRA, J. P. F.; SPOLADORE, D. S. Influência da adubação nas relações entre constituintes químicos dos grãos, dos grãos e das folhas, e a produção de milho. **Bragantia**, v.35, n. 36, p. 413-432, 1976.

- GELDERBLUM, 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.
- GELDERBLUM, W.C.A., JASKIEWICZ, K., MARASAS, W.F.O. The cancer initiating potential of the fumonisin B mycotoxins. **Carcinogenesis**. v.13, p.433 - 437, 1992.
- GELINEAU-VAN W. J.; VOSS K.A.; STEVENS V.L.; SPEER M.C.; RILEY R.T. Maternal fumonisin exposure as a risk factor for neural tube defects. **Advances. Food & Nutrition Research**, v. 56, p. 145-181, 2009
- 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.
- GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by freeliving bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 109–117, 1995.
- GOULD, G. Predictive mathematical modeling of microbial growth and survival in foods. **Food Science Technology Today**, v. 3, p. 80-92, 1989.
- GRANT, C.A.; FLATEN, D.N.; TOMASIEWICZ, D.J.; SHEPPARD, S.C. **Importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta**. Inf. Agronômicas, POTAFOS, n.95, p.1-5, 2001.
- GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**. 2^a edição. New York: Wiley – Liss Inc.; 1994.
- 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**, v. 82, p. 657–662, 1999.
- HALDER, A.; CHAKRABARTY, P. Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. **Folia Microbiológica**, v.38, p.325-330, 1993.
- HANAI, T. **HPLC: A practical guide**. UK: Ed. Royal Society of Chemistry, 1999.
- HARRISON, L. R., COLVIN, B.M., GREENE, J. T., NEWMAN, L.E., COLE, J.R. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin b₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 217–221, 1990.
- HARTL, M.; HUMPF, H. U. Simultaneous determination of fumonisin B₁ and hydrolyzed fumonisin B₁ in corn products by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. **Journal Agricultural of Food Chemistry**, v. 47, p. 5078-5083, 1999.
- HASCHEK, W. M.; GUMPRECHT, L. A.; SMITH, G. Et al. Fumonisin toxicosis in swine: An overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. **Environmental Health and Perspectives**, v. 109, p. 251-257, 2001.
- HASHEMI, D.A.; HERBERT, S.J. Intensifying plant density response of corn with artificial shade. **Agronomy Journal**, v.84, n.4, p.547-551, 1992.
- HASSEGAWA, R.H.; FONSECA, H.; FANCELLI, A.L.; SILVA, V.N.; SCHAMMASS, E.A.; REIS, T.A.; CORRÊA, B. Influence of macro and micronutrient fertilization on fungal contamination and fumonisin production in corn grains. **Food Control**, v. 19, p. 36–43, 2008.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, A.; HEYDRICH-PÉREZ, M.; ACEBO-GUERRERO, Y.; VELAZQUEZ-DEL VALLE, M.G.; HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N. Antagonistic activity of Cuban native rhizobacteria against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. in maize (*Zea mays* L.). **Applied Soil Ecology**, v. 39, p 180-186, 2008.

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.

HIROOKA, E. Y.; VIOTTII, N.M.A.; MAROCHI, M.A.; ISHI, K.; UENO, Y. Leucoencefalomalácia em equinos do Norte do Paraná. **Revista de Microbiologia**, v. 21, p. 223-227, 1990.

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.

INDEX FUNGORUM. Disponível em: < <http://www.indexfungorum.org>>. Acesso em: 06 maio 2010.

ITO, M.F.; MASCARENHS, H.A.A.; TANAKA, M.A.S.; DUDIENAS, C.; TANAKA, R.T.; GALLO, P.B.; MIRANDA, M.A.C. Efeito residual da adubação potássica e da calagem sobre a incidência de *Phomopsis* spp. em sementes de soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, p. 44-49, 1994.

JACKSON, M.A.; BENNET, G.A. Production of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme* NRRL 13616 in submerged culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2296-2298, 1990.

JONES, R.K.; DUNCAN, H.E. Effect of nitrogen fertilizar, planting date and harvest date on aflatoxin production in corn inoculated with *Aspergillus flavus*. **Plant Disease**, v. 65, p. 741-747, 1981.

KANAMPIU, F. K; FRIESEN, D.; GRESSEL, J. CIMMYT collaborative efforts unveil herbicide-coated maize seed technology to curb problematic *Striga*. **Integrated Pest Management Reviews**, v. 7, n. 1, p. 63-64, 2002.

KELLERMAN, T. S.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; GELDERBLOM, W. C. A.; CAWOOD, M.; COETZER, J. A. W. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B₁. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 269 – 275, 1990.

KHAN, M.R.; DOOHAN, F.M. Bacterium-mediated control of *Fusarium* head blight disease of wheat and barley and associated mycotoxin contamination of grain. **Biological Control**, v. 48, p. 42-47, 2009.

KLOPPER, J.; LIFSHITZ, R.; SCHROTH, M. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. **ISI Atlas of Science: Animal and Plant Science**. p.60-64, 1988.

LA CAMPA, R. D.; MILLER, J. D.; HENDRICKS, K. Fumonisin in tortillas produced in small-scale facilities and effect of traditional masa production methods on this mycotoxin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4432-4437, 2004.

- LATOURE, X.; LEMANCEAU, P. Carbon and energy metabolism of oxidasepositive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp. **Agronomie**, v. 17, p. 427-443, 1997.
- 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.; FRITSCH, K.L.; ROTTINGHAUS, G.E. Effects of fumonisin B1 on selected immune responses in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 78, p. 1275-1282, 1999.
- LISKER, N.; LILLEHOJ, E.B. Prevention of mycotoxin contamination (principally aflatoxins and *Fusarium* toxins) at the preharvest stage, 1991. In: BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F. Influence of nitrogen fertilization on mycotoxin contamination of maize kernels. **Crop Protection**, v. 27, p. 222 - 230, 2008.
- LOVIC, B.; HECK, C.; GALLIAN, J.J.; ANDERSON, A. J. Inhibition of the sugarbeet pathogens *Phoma betae* and *Rhizoctonia solani* by bacteria associated with sugarbeet seeds and roots. **Journal of Sugar-Beet Research**, v. 30, n. 3, p. 169-184, 1993.
- LUZ, W.C. Evaluation of plant growth-promoting and bioprotecting rhizobacteria on wheat crop. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 3, 2001.
- MALLMANN, C. A.; **Micotoxinas**. I Congresso Uruguayo de Produccion Porcina, p. 119-125; 1998.
- MARASAS, W. F., KELLERMAN, T. S., GELDERBLUM, W. C., COETZER, J. A., THIEL, P. G., VAN DER LUGT, J. J. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ 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.
- 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.
- MARSARO JÚNIOR, A. L.; LAZZARI, S. M. N.; SOUZA, J. L.; LAZZARI, F. A.; CÂNDIDO, L. M. B. Influência de diferentes sistemas de adubação na composição nutricional do milho *Zea*

- mays* L. (Poaceae) e seus efeitos no ataque de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleóptera: Curculionidae) no produto armazenado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 51-64, 2007.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plant**. 2.ed. New York: Academic Press, 889p, 1995.
- MARSCHNER, H. Relations hip between mineral nutrition and plant disease and pests. In: Marschner, H. (Ed.) *Mineral nutrition of higher plants*. London. Academic Press., p. 369-390, 1996.
- 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.
- MILLER, 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 B₁ 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 B₁ and B₂ in corn products by ion pair chromatography with o-phthaldialdeyde postcolumn derivatization and fluorometric detection. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 842-847, 1996.
- MYOUNGSU, P.; CHUNGWOO, K.; JINCHUL, Y.; HYOUNGSEOK, L.; WANSIK, S.; SEUNGHWAN, K.; TONGMIN, S. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. **Research in Microbiology**, v. 160, p. 127-133, 2005.
- 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.
- MOBLEY, H.L.; HAUSINGER, R.P. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 53, n. 1, p. 85-108, 1989.
- 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.
- MOSS, M. O. Mycotoxin review- 2. *Fusarium*. **Mycologist**, v. 16, p. 158-161, 2002.
- MUNKVOLD, G.P., DESJARDINS, A.E. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence?. **Plant Disease**, v. 81, n. 6, p. 556-565, 1997.
- MUNKVOLD, G.P. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, p. 99–116, 2003.
- 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.
- NEHMI, I.M.D.; FERRAZ, J.V.; NEHMI FILHO, V.A.; SILVA, M.L.M. (Coord.). **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos,. 496 p, 2004
- 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, 1983.
- NELSON, P.E.; PLATTNER, R.D.; SHACKELFORD, D.D.; DESJARDINS, A.E. Production of fumonisins by *Fusarium verticillioides* strains from various substrates and geographic areas. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2410-2412, 1991.
- 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.; 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.
- 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.
- OVERREIN, L.N.; MOE, P.G. Factors affecting urea hydrolysis and ammonium volatilization in soil. **Soil Science Society of America Proc.**, v. 31, p. 57-61, 1967.

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.** 19th 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.

PEREIRA, J.C. **Interações entre as Populações de Actinomicetos e outros Organismos na Rizosfera.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000.

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

PEREIRA, P., NESCI, A., ETCHEVERRY, M. Effects of biocontrol agents on *Fusarium verticillioides* count and fumonisin content in the maize agroecosystem: Impact on rhizospheric bacterial and fungal groups. **Biological Control**, v. 42, p. 281–287, 2007.

PEREIRA, P., NESCI, A., CASTILLO, C., ETCHEVERRY, M. Impacto of bacterial biological control agents on fumonisin B1 content and *Fusarium verticillioides* infection of field-grown maize. **Biological Control**, v. 53, p. 258–266. 2010.

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.

PLATTNER, R.D.; SHACKELFORD, D.D. Biosynthesis of Labeled Fumonisins in Liquid Cultures of *Fusarium verticillioides*. **Mycopathologia**, v. 117, p. 17 – 22, 1992.

POMMER, C.V; SAWAZAKI, E. Influência da adubação mineral continua na produção de proteína e no seu teor percentual nos grãos de milho. **Bragantia**, v.40, n. 9, 1981

POZZI, C. R.; ARCARO, J. R. P.; JÚNIOR, I. A.; FAGUNDES, H.; CORRÊA, B. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. **Ciência Rural**. v. 32, n. 5, 2002.

QUADROS, P. de D. **Inoculação de *Azospirillum spp.* em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul.** Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

RAIJ, B. van. **Fertilidade do solo e adubação.** Piracicaba: Potafos, 343 p, 1991.

REYNERI, A. The role of climatic condition on micotoxin production in cereal. **Veterinary Research Communications**, v. 30, n. 1, p. 87–92, 2006.

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 esophageal 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.

RIBEIRO, N. A.; CASA, R. T.; BOGO, A.; SANGOI, L.; WILLE, L. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e produtividade de grãos de genótipos de milho em diferentes sistemas de manejo. **Ciência Rural**, v. 35, p. 1003-1009, 2005.

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.

RODRIGUEZ-DEL-BOSQUE, L.A. Impact of agronomic factors on aflatoxin contamination in preharvest field corn in northeastern Mexico. **Plant Disease**, v. 80, p. 988 – 993, 1996.

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.

RUTGER, J.N.; CROWDER, L.V. Effect of high plant density on silage and grain yield of six corn hybrids. **Crop Science**, Madison, v. 7, n. 3, p. 182-184, 1967.

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.; DEVLIEGHERE, 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.

SANGOI, L.; SALVADOR, R. J. Dry matter production and partitioning of maize hybrids and

- dwarf lines at four plant populations. **Ciência Rural**, v. 27, n. 1, p. 1-6, 1997.
- SANGOI, L. Understanding plant density effects on maize growth and development: an important issue to maximize grain yield. **Ciência Rural**, Santa Maria, 2000.
- SANGOI, L.; ENDER, M.; GUIDOLIN, A. F.; BOGO, A.; KOTHE, D. M. Incidência e severidade de doenças de quatro híbridos de milho cultivados em diferentes densidades de planta. **Ciência Rural**, v. 30, p.17-21, 2000.
- SANGOI, L. Et al. Bases morfofisiológicas para tolerância dos híbridos modernos de milho a altas densidades de plantas. **Bragantia**, v. 61, p. 101-110, 2002.
- SANGOI, L.; SILVA, P.R.F.; ARGENTA, G.; HORN, D. Bases morfo-fisiológicas para aumentar a tolerância de cultivares de milho a altas densidades de plantas. In: **Reunião Técnica Catarinense de Milho e Feijão**, 4., Lages, SC. Resumos Expandidos. Lages: CAV-UDESC, p. 19-24, 2003.
- SANTOS I.M.; ABRUNHOSA L.; VENANCIO A.; LIMA N.; The effect of culture preservation techniques on patulin and citrinin production by *Penicillium expansum*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 272–275, 2002.
- SANTOS, M. H. L. C.; MARIANO, R. L. R.; CAMARA, T. G.; ANDRADE, A. G.; WILLADINO, L.; LIMA, G. P. P. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. **Revista Hoehnea**, v. 32, n. 2, p. 1-8, 2005.
- 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, 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, n. 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.
- SCUSSEL, V. M. **Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem de Grãos**. Cap. II – Micotoxinas emergentes, p. 2-24, 2000.
- SHELBY, R.A.; WHITE, D.G.; BAUSKE, E.M. Differential Fumonisin Production in Maize Hybrids. **Plant Disease**, v. 78, p. 582 – 584, 1994.
- SHEPHARD, G. S., SYDENHAM, E. W.; THIEL, P. G.; GELDERBLOM, W. C. A. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, p. 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**, v. 48, p. 1860–1864, 2000.

SHIOGA, P. S.; OLIVEIRA, E. L.; GERAGE, A. C. Densidade de plantas e adubação nitrogenada em milho cultivado na safrinha. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 3, n. 3, p. 381-390, 2004.

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

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**, v. 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.

SILVA, P.R.F.; SANGOI, L.; ARGENTA, G.; STRIEDER, M.L. **Arranjo de plantas e sua importância na definição da produtividade em milho**. Porto Alegre: Evangraf, 63 p., 2006.

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

SOTTERO, A. N. **Colonização radicular e promoção de crescimento vegetal por rizobactérias**. Mestrado em agricultura tropical e subtropical – Instituto Agrônomo Campinas, Campinas. 2003.

SOUZA, G.L. de. **Influência de densidade de plantas e espaçamento entre linhas sobre o rendimento de grãos, interceptação de luz e outras características agrônômicas de duas cultivares de milho (*Zea mays* L.)**. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Agronomia. Dissertação de Mestrado. 98p., 1976.

STAUFFER, M. D.; SULEWSKI, G. Fósforo: nutriente essencial para a vida. **Informações Agrônômicas**, n.102, p.1-2, 2003.

SYDENHAM, E. W.; GELDERBLUM, W.C.A.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁, 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.; THIEL, P. G. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in foods and feeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 75, p. 313-318, 1992.

SYDENHAM, E. W.; SHEPARD, G. S.; THIEL, P. G.; STOCKENSTROM, S., SNIJMAN, P. W.; VAN SCHALKWYK, D. J. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂, and B₃ 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.

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.

TOLLENAAR, M.; AGUILERA, A.; NISSANKA, S.P. Grain yield is reduced more by weed interference in an old than in a new maize hybrid. **Agronomy Journal**, v. 89, n. 2, p. 239-246, 1997.

TOLLENAAR, M.; WU, J. Yield improvement in temperate maize is attributable to greater stress tolerance. **Crop Science**, v. 39, p. 1597-1604, 1999.

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. Dissertação Mestrado em Genética e Melhoramento. Universidade Estadual de Londrina. 96 p., 1999.

TRENTO, S. M.; IRGANG, H. H.; REIS, E. M. Efeito da rotação de culturas, da monocultura e da densidade de plantas na incidência de grãos ardidos em milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 6, p. 609-613, 2002.

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**, v. 78, p. 705-710, 1995.

TSENG, T.; LEE, K.; DENG, T.; LIU, C.; HUANG, J. Production of fumonisin by *Fusarium* species of Taiwan. **Mycopathologia**, v. 130, p. 117-121, 1995.

USDA – United States Department of Agriculture. Disponível em: <<http://www.usda.gov>>. Acesso em: 2 junho 2010.

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.

VENTURA, J.A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados. Parte I – História, meios e procedimentos de cultivo. **Revisão Anual de Patógenos de Plantas**, v. 7, p. 271-298, 1999.

VENTURA, J.A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados. Parte II – Chaves para identificação. **Revisão Anual de Patógenos de Plantas**, v. 8, p. 303-338, 2000.

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

VISCONTI, A.; DOKO, M. B. Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v. 77, p. 546-550, 1994.

- VISCONTI, A.; SOLFRIZZO, M.; DE GIROLAMO, A. Determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity column cleanup: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 84, p. 1828–1837, 2001.
- VITTI, G. C.; WIT, A.; FERNANDES, B. E. P. **Eficiência agrônômica dos termofosfatos e fosfatos reativos naturais**. In: Simpósio sobre fósforo na agricultura brasileira, 1, 2004, Piracicaba. Anais... Piracicaba: POTAFÓS, p. 690-694, 2004.
- 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.
- WEIBKING, T. S., LEDOUX, D. R., BERMUDEZ, A. J., TURK, J. R., ROTTINGHAUS, G. E., WANF, E., MERRILL, A. H. Effects of Feeding *Fusarium moniliforme* Culture Material, Containing Known Levels of Fumonisin B₁ on the Young Broiler Chick. **Poultry Science**, v. 72, p. 456 – 466, 1993.
- WEIDENBÖRNER, M. Food and Fumonisins. **Europe Food Research Technology**, v. 212, p. 262 – 273, 2001.
- 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 B₁ levels associated with a epizootic of equine leukoencephalomalacia. **Journal of Veterinarian Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 213-216, 1990.
- WHIPPS, J. M. Developments in the biological control of soilborne plant pathogens. In: CALLOW, J.A. (Ed.). **Advances in botanical research**. Birmingham: Academic, v. 26, p. 1-84, 1997.