



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALINE FRANCISCA DE SOUZA

**ESTRATÉGIAS DE CONTROLE PRÉ E PÓS COLHEITA DA
CONTAMINAÇÃO POR MICOTOXINAS EM GRÃOS DE
MILHO (*ZEA MAYS L.*)**

ALINE FRANCISCA DE SOUZA

**ESTRATÉGIAS DE CONTROLE PRÉ E PÓS COLHEITA DA
CONTAMINAÇÃO POR MICOTOXINAS EM GRÃOS DE
MILHO (*ZEA MAYS L.*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como um dos requisitos para a obtenção do Título de mestre.

Orientador (a): Prof Dr^a. Elisabete Yurie Sataque Ono.

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S729e	<p>Souza, Aline Francisca de Estratégias de controle pré e pós colheita da contaminação por micotoxinas em grãos de milho (<i>Zea mays</i> L.) / Aline Francisca de Souza – Londrina, 2011. 126 f.: il.</p> <p>Orientador: Elisabete Yuri Sataque Ono. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2011. Inclui bibliografia</p> <p>1. Milho como alimento – Teses. 2. Micotoxinas – Teses. 3. Adubação orgânica – Teses. 4. Biotecnologia agrícola – Teses. 5. <i>Pseudomonas</i> – Teses. I. Ono, Elisabete Yurie Sataque. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 663.1</p>
-------	---

ALINE FRANCISCA DE SOUZA

**ESTRATÉGIAS DE CONTROLE PRÉ E PÓS COLHEITA DA
CONTAMINAÇÃO POR MICOTOXINAS EM GRÃOS DE
MILHO (*ZEA MAYS* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como um dos requisitos para a obtenção do Título de mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Elisabete Yurie Sataque Ono
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Maria Josefa Santos Yabe
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Claudemir Zucareli
UEL – Londrina – PR

Londrina, 23 de maio de 2011.

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos e amigos pelo carinho, apoio, amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Prof Dr^a Elisabete Yurie Sataque Ono pelo carinho, dedicação, orientação, paciência e ensinamentos fundamentais para realização deste trabalho.

Ao CNPq, Fundação Araucária, Fundo Paraná/SETI, PPSUS/Ministério da Saúde, CNPq/MAPA, CAPES pelo apoio financeiro.

À ProP Dr^a Elisa Yoko Hirooka pelo auxílio, oportunidade de trabalho.

Ao Prof. Dr. Claudemir Zucareli, pela disponibilização das amostras de milho.

Ao Prof Dr. Antônio Sérgio de Oliveira pela oportunidade e disponibilização da micotoxina e dos materiais sorventes para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Dionísio Borsato e a Prof.^a Maria Josefa Santos Yabe, pelo auxílio e paciência dispendida na análise estatística dos dados.

Aos docentes do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia pelos ensinamentos valiosos durante todo o curso.

Aos amigos Márcia Pereira, Jaira Pereira Henrique, Kelly Nayara Pereira Barbosa pelo companheirismo, carinho, amizade e alegrias que colaboraram indiretamente para o desenvolvimento desse trabalho.

À Ana Elisa Stefani Vercelheze pela amizade, apoio, atenção e companheirismo em todos os momentos solicitados.

Aos amigos Gustavo Jabor Gozzi, Rafael Fernandes Santos, Adriana Casavechia Petri, Carolina Nachi Rossi, Luciana Von Hohendorff Ferreira, Elaine Cunha Moreno, Virginia Carla Falcão, Francine Fernandes, Patrícia Bittencourt, Luciana Carvalho Grade, Paulo Ricardo Franco, Kelly Goes, Fernando Bazani, Douglas Gomes e Leonardo Cardoso pela amizade, apoio, companheirismo, incentivos indispensáveis nos momentos difíceis durante o curso e pela alegria que sempre me proporcionaram.

Aos amigos Jurandir P. Pinto, Ismael Rodriguez Amador e Luiz Cesar Porto pela amizade e companheirismo no decorrer do dia-dia.

Aos colegas de laboratório e estagiários Thais Lemes, Andressa Lofrano, Tiago Zaninelli e Renan Cantanti pelo carinho, amizade e colaboração na realização deste trabalho.

À Luciana Bernd, Joice Sifuentes dos Santos, Thiago Montagner, Angélica Ishikawa, Cássia Reika Takabayashi e Valquíria Sheila Zago pelo apoio e colaboração.

À Renata Sobottka pela amizade e indispensável ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Paulo Vitor Nascimento pelo apoio, colaboração, companheirismo e amizade em todos os momentos solicitados.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (CCE/UEL): Nelson Janeiro Rodriguez, Sílvia Borba da Costa Avelino, Sérgio Nascimento Evangelista, Sandra Aparecida Defende, Neusa Zamuner de Souza e colegas de laboratório pela amizade, colaboração e auxílio.

À funcionária do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CCA/UEL) Patrícia Sambatti pela colaboração.

A todos que contribuíram de todas as formas para que este trabalho fosse finalizado.

SOUZA, Aline F. **Estratégias de controle pré e pós colheita da contaminação por micotoxinas em grãos de milho (*Zea mays* L.)**. 2011. 126 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

O milho (*Zea mays* L.) é um cereal de importância econômica mundial, caracterizado pela alta qualidade nutricional, que o torna susceptível à contaminação por fungos toxigênicos, como *Fusarium* spp. A contaminação pode ocorrer no campo, durante o desenvolvimento dos grãos, ou no período de colheita, reduzindo a qualidade do grão, além da produção de metabólitos secundários tóxicos (micotoxinas), que causam graves doenças em seres humanos e animais. A prevenção na pré-colheita constitui o melhor método para controlar a contaminação por micotoxinas, porém quando ocorre a contaminação, os riscos associados a toxinas devem ser controlados por procedimentos pós-colheita. No presente trabalho foi avaliada a contaminação fúngica e fumonisinas em diferentes cultivares de milho (Asteca, Caiano, IPR 114 e DKB 390), submetidos à adubação orgânica (cama de frango), mineral (NPK) e controle (sem adubação) e a utilização de um híbrido de milho (Mon 810) submetido à adubação fosfatada (superfosfato triplo, fosfato de gafsa, fosfato de itafós e a mistura superfosfato triplo e fosfato de gafsa, superfosfato triplo e fosfato de itafós e testemunha) com e sem a aplicação de inoculante (*Pseudomonas fluorescens*). Paralelamente foi realizada a otimização da remoção de desoxinivalenol (DON) *in vitro* por sorventes orgânico (β -glucana) e inorgânico (carvão ativado). O experimento das diferentes cultivares submetidas à adubação orgânica, mineral e controle foi conduzido sob delineamento experimental de blocos casualizados em esquema fatorial (4x3) nas safras de 2009 e 2010, totalizando 96 parcelas, enquanto o experimento com a cultivar submetida a diferentes fontes de fertilizantes fosfatados foi realizado em blocos casualizados, esquema fatorial (6x2) na safra de 2010, totalizando 48 parcelas. Os resultados foram avaliados por Análise Estatística de Componentes Principais (ACP). A otimização da remoção de DON por sorventes orgânico e inorgânico *in vitro* foi realizada por meio de um planejamento estatístico 2^4 e os resultados foram avaliados por meio da análise de variância ANOVA e Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). No tratamento com adubação orgânica e mineral, utilizando diferentes cultivares, a contaminação por *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. foi detectada em 83 % e 100 % das amostras na safra 2009 e em 100 % e 69 % das amostras na safra 2010, respectivamente. *Aspergillus* spp. foi detectado somente na safra 2009 em 14,5 % das amostras. As maiores médias de contaminação por fumonisinas (FB₁ + FB₂) foram detectadas nas cultivares Asteca (4,59 μ g/g), Caiano (3,04 μ g/g) e IPR 114 (4,04 μ g/g), enquanto que nos tratamentos com adubações, as amostras submetidas à adubação orgânica apresentaram maior média de contaminação por fumonisinas (3,74 μ g/g) quando comparada com os tratamentos sem adubação (3,15 μ g/g) e adubação mineral (2,18 μ g/g). A cultivar DKB 390, aliada ao tratamento com adubação mineral, apresentou menores níveis de fumonisinas (FB₁ + FB₂). Na aplicação de adubação fosfatada com e sem a aplicação de inoculante (*P. fluorescens*), na safra de 2010, *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp., foram detectados em 77 % e 75 % das amostras, respectivamente. As maiores médias de *Fusarium* spp. foram detectadas nos tratamentos testemunha, com ($2,6 \times 10^4$ UFC/g) e sem ($3,4 \times 10^4$ UFC/g) a aplicação de inoculante (*P. fluorescens*). A FB₁ e FB₂ foram detectadas em 100 % e 75 % das amostras, respectivamente. As maiores médias de fumonisinas (FB₁+FB₂) foram detectadas nos tratamentos sem *P. fluorescens* (de 0,18 a 1,12 Mg/g), enquanto que os tratamentos com a aplicação de *P. fluorescens* apresentaram a menor média de contaminação por fumonisinas (de 0,08 a 0,83 Mg/g). Quanto às diferentes fontes de

fertilizantes fosfatados, a menor contaminação por fumonisinas (0,17 Mg/g) foi detectada no tratamento com a aplicação do fosfato solúvel (Superfosfato triplo), fato que pode estar relacionado à disponibilidade imediata desse nutriente para a planta. Nos testes de sorção de desoxinivalenol (DON) *in vitro*, no modelo do planejamento estatístico 2⁴ a maior porcentagem de sorção ocorreu com a utilização de 2 % de carvão ativado e β-glucana na proporção 70:30 (>95,6 %), nos tempos de incubação de 30, 60 e 90 minutos. As menores sorções foram detectadas utilizando 0,2 % de carvão ativado e β-glucana na proporção 0:100 (de 14,4 % a 77,3 %). Os valores de pH (3,0, 5,0 e 7,0) não influenciaram no processo de sorção de DON *in vitro*. A mistura dos dois sorventes (carvão ativado e β-glucana) na concentração de 2 % foi eficaz na faixa de pH entre 3,0 e 7,0, cobrindo a faixa encontrada no trato gastrointestinal de animais ruminantes e monogástricos, sugerindo seu potencial para minimizar o risco de contaminação por DON. A contaminação de milho por micotoxinas no campo pode ser reduzida por meio de práticas agrícolas (seleção de cultivares e aplicação de fertilizantes). Quando a contaminação em campo é inevitável, práticas de descontaminação, como a aplicação de sorventes podem ser aplicadas a fim de minimizar os riscos à saúde animal.

Palavras-Chave: Fumonisinas. Desoxinivalenol. Adubação orgânica. Adubação mineral. Adubação fosfatada. Sorventes. Rizobactérias. *Pseudomonas fluorescens*.

SOUZA, Aline F. **Strategies for pre and post harvest control of mycotoxin contamination in maize grains (*Zea mays* L.)**. 2011. 126 p. Dissertation (Master in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

Maize (*Zea mays* L.) is an economically important staple crop worldwide, characterized by high nutritional quality, which makes it susceptible to contamination by toxigenic fungi such as *Fusarium* sp. Contamination may occur in the field during the grain development, or at harvest time, reducing the grain quality, in addition to the production of secondary metabolites (mycotoxins) that cause severe diseases in humans and animals. The pre-harvest prevention is the best approach for controlling mycotoxin contamination, but when contamination occurs, the risks associated with toxins should be controlled by post-harvest procedures. In the present study the fungal and fumonisin contamination were evaluated in different cultivars (Asteca, Caiano, IPR 114 and DKB 390), submitted to organic fertilization (poultry litter), mineral (NPK) and control (without fertilization) as well as in a maize cultivar (Mon 810) with different phosphate fertilization (Triple Superphosphate, Gafsa Phosphate, Itafôs Phosphate and the mixture triple superphosphate and Gafsa phosphate, triple superphosphate and Itafôs phosphate and control without fertilization) with and without the inoculant application (*Pseudomonas fluorescens*). In addition, optimization of deoxynivalenol (DON) removal *in vitro* by organic (β -glucan) and inorganic adsorbents (activated charcoal) was carried out. The experiment of different cultivars subjected to organic fertilization, mineral and control was conducted under randomized block factorial design (4x3) in 2009 and 2010 growing seasons, totaling 96 samples, while the experiment with the Mon 810 cultivar under different phosphate fertilizer sources was carried out in randomized block factorial design (6x2) in 2010 growing season, totaling 48 samples. The results were analyzed by Statistical Analysis of Principal Components (ACP). Optimization of DON removal *in vitro* by organic and inorganic adsorbents was evaluated using a 2^4 statistical design and results were evaluated by ANOVA and Response Surface Methodology (RSM). In organic and mineral fertilization experiments using different cultivars, the contamination by *Fusarium* sp. and *Penicillium* sp. was detected in 83 % and 100 % maize samples in 2009 and 100 % and 69 % samples in 2010 growing season, respectively. *Aspergillus* sp. was detected only in the 2009 growing season in 14.5 % samples. The highest mean fumonisin contamination (FB₁ + FB₂) was detected in Asteca (4.59 $\mu\text{g/g}$), Caiano (3.04 $\mu\text{g/g}$) and IPR 114 (4.04 $\mu\text{g/g}$), whereas in fertilization treatments, the samples submitted to organic fertilization had higher mean fumonisin contamination (3.74 $\mu\text{g/g}$) when compared to treatments without fertilizer (3.15 $\mu\text{g/g}$) and mineral fertilizer (2.18 $\mu\text{g/g}$). The lowest fumonisin (FB₁ + FB₂) levels were detected in DKB 390 cultivar treated with mineral fertilization. In the phosphate fertilization with and without inoculant application (*P. fluorescens*), in 2010 growing season, *Fusarium* sp. and *Penicillium* sp. were detected in 77 % and 75 % samples, respectively. The highest mean of *Fusarium* sp. was detected in control without fertilization, with (2.6×10^4 CFU/g) and without (3.4×10^4 CFU/g) the inoculant application (*P. fluorescens*). FB₁ and FB₂ were detected in 100 % and 75 % samples, respectively. The highest mean fumonisin levels (FB₁ + FB₂) were detected in treatments without *P. fluorescens* (from 0.18 to 1.12 $\mu\text{g/g}$), while treatments with *P. fluorescens* showed the lowest mean fumonisin contamination (from 0.08 to 0.83 $\mu\text{g/g}$). Concerning the different sources of phosphate fertilizers, the lowest fumonisin contamination (0.17 $\mu\text{g/g}$) was detected in treatment with soluble phosphate application (Triple Superphosphate) which may be related to the availability of this nutrient for the plant.

In the adsorption tests of deoxynivalenol (DON) *in vitro*, in the 2⁴ experimental design model the highest percentage of adsorption occurred using 2 % activated charcoal and β -glucan at 70:30 ratio (> 95.6 %) incubated at 30, 60 and 90 minutes. The lowest adsorptions were detected using 0.2 % activated charcoal and β -glucan at 0:100 ratio (from 14.4 % to 77.3 %). The pHs (3.0, 5.0 and 7.0) showed no influence on DON adsorption *in vitro*. The mixture of the two adsorbents (activated carbon and β -glucan) in 2 % concentration was effective in the pH range between 3 and 7, covering the range found in the gastrointestinal tract of ruminants and monogastric animals, suggesting its potential to minimize the risk of DON contamination. The results show that the mycotoxin contamination of maize in the field can be reduced by agricultural practices (cultivar selection and fertilizer application). When contamination is unavoidable in field practices, decontamination and the application of adsorbents can be applied in order to minimize risks to animal health.

Keywords: Fumonisin. Deoxynivalenol. Organic fertilization. Fertilization. Mineral fertilization. Adsorbents. Rhizobacteria. *Pseudomonas fluorescens*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Níveis máximos de fumonisinas totais em milho e derivados recomendados pela USFDA para alimentação humana e animal.....	24
Tabela 2 – Limites máximos tolerados para desoxinivalenol em grãos, alimentos processados e rações.....	28
Tabela 3 – Composição média dos esterco suínos, bovinos e frangos	35
Tabela 4 – Sorção <i>in vitro</i> de micotoxinas por diferentes sorventes orgânicos e inorgânicos	39
Tabela 5 – Descrição das cultivares submetidos à adubação orgânica, mineral e controle (sem adubação), nas safras de 2009 e 2010	44
Tabela 6 – Análise química do solo da área experimental localizada na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina, safras 2009 e 2010	44
Tabela 7 – Análise química do fertilizante orgânico (cama de frango), safras 2009 e 2010	45
Tabela 8 – Descrição do tratamento utilizando a cultivar Mon 810, submetida a diferentes fontes de fosfato (SFT, GAFSA e ITAFÓS) com e sem a aplicação de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	46
Tabela 9 – Análise química do solo da área experimental da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina, safras 2009 e 2010	46
Tabela 10 – Níveis do planejamento estatístico 2 ⁴ contendo três pontos centrais, com variáveis codificadas e decodificadas para avaliação do efeito do pH, da concentração de DON, da percentagem e da proporção dos sorvente carvão ativado e β -glucana sobre a sorção de DON, nos tempos de incubação de 30, 60 e 90 minutos <i>in vitro</i>	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Anatomia e morfologia do grão de milho	18
Figura 2 – Tipos de milho e as relativas proporções do endosperma farináceo e vítreo.....	18
Figura 3 – Ciclo da infecção da planta de milho por <i>Fusarium</i> spp. no campo	20
Figura 4 – Estrutura química de fumonisinas	22
Figura 5 – Comparação da molécula de fumonisina com a esfinganina	23
Figura 6 – Estrutura química dos Tricotecenos A, B, C e D	26
Figura 7 – Esquema da organização química da parede celular de <i>Sccharomyces cerevisiae</i> (A) e microscopia eletrônica de varredura da parede celular de levedura (B).....	40
Figura 8 – Conformação favorável para interação entre β -glucana e DON, setas indicam os hidrogênios envolvidos na interação.....	41
Figura 9 – Temperaturas máxima, mínima, média e precipitação pluviométrica diárias do período de condução do experimento em Londrina-PR, safra 2009.....	42
Figura 10 – Temperaturas máxima, mínima, média e precipitação pluviométrica diárias do período de condução do experimento em Londrina-PR, safra 2010.....	43
Figura 11 – Contagem de bolores e leveduras.....	48
Figura 12 – Extração de Fumonisinas.....	49
Figura 13 – Determinação de fumonisinas	50
Figura 14 – Determinação de nitrogênio	51
Figura 15 – Teste de sorção e extração de desoxinivalenol.....	54
Figura 16 – Determinação de desoxinivalenol	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	MILHO	17
3.2	MICOTOXINAS	19
3.2.1	Fumonisinias	21
3.2.2	Tricotecenos	25
3.3	CONTROLE DE MICOTOXINAS PRÉ E PÓS COLHEITA	29
3.3.1	Cultivares de Milho	29
3.3.1.1	Milho crioulo	30
3.3.1.2	Variedade de polinização aberta (VPA)	30
3.3.1.3	Milho híbrido	31
3.3.2	Adubação	31
3.3.2.1	Adubação mineral	31
3.3.2.2	Adubação orgânica	34
3.3.2.3	Inoculantes	35
3.3.3	Controle de Contaminação da Colheita e Armazenagem	36
3.3.4	Métodos de Detoxificação	37
3.3.4.1	Sorventes	38
3.3.4.2	Tipos de sorventes	38
4	METODOLOGIA	42
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA: ADUBAÇÃO ORGÂNICA , MINERAL, FOSFATADA E CONTROLE	42
4.1.1	Adubação Orgânica, Mineral e Controle	43
4.1.1.1	Condução experimental	44
4.1.2	Adubação Fosfatada, Inoculação e Controle	45
4.1.2.1	Condução experimental	46

4.2	ANÁLISE DE MICROBIÓTA FÚNGICA.....	47
4.3	DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS.....	48
4.4	DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE ÁGUA (AW).....	50
4.5	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA.....	50
4.6	TESTE DE SORÇÃO DE DESOXINIVALENOL.....	52
4.6.1	Calibração do Padrão de Desoxinivalenol.....	52
4.6.2	Preparo da Curva Padrão.....	52
4.6.3	Testes de Sorção In Vitro.....	52
4.6.4	Extração de Desoxinivalenol.....	53
4.6.5	Determinação de Desoxinivalenol Adsorvido.....	54
4.6.6	Interpretação dos Resultados.....	55
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
	CONTAMINAÇÃO POR FUNGOS E FUMONISINAS EM GRÃOS DE MILHO (ZEA MAYS L.) DE DIFERENTES CULTIVARES SOB ADUBAÇÃO ORGÂNICA E MINERAL.....	57
	FONTES DE FÓSFORO ASSOCIADAS À INOCULAÇÃO COM PSEUDOMONAS FLUORESCENS NA CONTAGEM FÚNGICA E CONTAMINAÇÃO POR FUMONISINAS EM MILHO.....	82
	REMOÇÃO DE DESOXINIVALENOL IN VITRO PELA MISTURA DE SORVENTES ORGÂNICO E INORGÂNICO.....	100
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	112
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura amplamente difundida e cultivada no mundo devido à facilidade de adaptação aos mais diferentes ecossistemas. A alta qualidade nutricional expõe os grãos desse cereal à contaminação por microrganismos, principalmente fungos toxigênicos como *Fusarium*, cujo crescimento é favorecido pelo clima subtropical predominante no Brasil. Entre as micotoxinas produzidas por esse fungo estão zearalenona, desoxinivalenol e fumonisinas.

A contaminação por *Fusarium* spp. pode ocorrer no campo, durante o desenvolvimento dos grãos, ou no período de colheita. Estima-se que 90 % do milho em todo mundo apresente alguma fitopatologia e/ou contaminação relacionada a esse gênero.

Dentre os problemas relacionados à contaminação por *Fusarium* spp. em grãos, podem-se citar as reduções na produtividade da cultura, nas taxas de germinação e vigor das sementes. No produto final, podem ocorrer alterações no sabor e odor, comprometendo desta forma, a palatabilidade e o consumo do alimento.

A ingestão de alimentos contaminados por micotoxinas pode ocasionar recusa alimentar, diminuição do peso corporal, imunossupressão, redução da capacidade reprodutiva, efeitos teratogênicos, carcinogênicos e estrogênicos.

A principal estratégia para minimizar a contaminação de grãos por micotoxinas são as boas práticas agrícolas, seguido de cuidados na manipulação, processamento, armazenamento e distribuição dos grãos para consumo humano e animal. A escolha de cultivares resistentes à contaminação por fungos toxigênicos, época de semeadura e colheita, controle de pragas, manejo, fertilidade de solo e métodos de descontaminação, podem garantir a qualidade do milho produzido.

As práticas de manejo da cultura do milho, principalmente a adubação, podem influenciar na incidência de doenças e conseqüentemente na contaminação dos grãos. Os fertilizantes orgânicos, caracterizados por possuírem elevado teor de matéria orgânica e nutrientes, principalmente nitrogênio, quando aplicados no solo podem favorecer o aumento da população microbiana e suprimir o desenvolvimento de patógenos, além de liberar gradativamente os nutrientes, evitando estresse da planta.

A aplicação de fósforo em doses adequadas pode aumentar a resistência da raiz contra infecção por microrganismos patogênicos, devido ao aumento da síntese de fosfolipídeos na membrana plasmática da raiz que impede a invasão de microrganismos oportunistas. A aplicação simultânea de fósforo e um inoculante, como *Pseudomonas*

fluorescens, permite maior solubilização do fosfato inorgânico, disponibilizando-o para absorção pela planta. Os inoculantes também produzem fitormônios e compostos antimicrobianos, que podem contribuir com o crescimento da planta, bem como reduzir ou prevenir os efeitos deletérios de microrganismos patogênicos presentes no solo, respectivamente.

Embora as estratégias de prevenção no campo possam reduzir a produção de micotoxinas, muitas vezes a contaminação é inevitável. Vários métodos de detoxificação têm sido desenvolvidos para proteger animais contra essa contaminação, sendo que, uma alternativa promissora é a utilização de materiais sorventes.

Os sorventes (orgânicos e inorgânicos) atuam como seqüestradores, ligando-se às micotoxinas no trato gastrointestinal e reduzindo o grau de absorção da micotoxina pelo intestino, diminuindo desta forma, a toxicidade sistêmica no organismo. A eficiência da ligação entre o sorvente e a toxina, depende das propriedades químicas e físicas de ambas as moléculas. Devido a essas diferenças de parâmetros, torna-se importante o estudo da eficácia de cada material sorvente.

Considerando os efeitos benéficos da aplicação de adubos orgânicos, fosfatados e inoculantes para a cultura do milho, bem como a importância da detoxificação de alimentos contaminados por micotoxinas, o presente estudo teve como objetivos avaliar o efeito de diferentes práticas agrícolas (cultivares, adubações e a aplicação de inoculantes) na contaminação de milho por fungos, fumonisinas, teor de proteína e atividade de água, assim como a eficácia de sorventes (orgânico e inorgânico) na remoção de desoxinivalenol *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de diferentes práticas agrícolas na contaminação de milho por fungos, fumonisinas, teor de proteínas e atividade de água, assim como a eficácia de sorventes orgânico (β -glucana) e inorgânico (carvão ativado) na remoção de desoxinivalenol *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Avaliar a microbiota fúngica e concentrações de fumonisinas em amostras de diferentes cultivares de milho (Asteca, Caiano, DKB 390 e IPR 114), tratadas com adubação orgânica (cama de frango), mineral (NPK) e controle (sem fertilizante).
- Avaliar a microbiota fúngica e concentrações de fumonisinas em milho submetido à adubação com diferentes fontes de fosfato (superfosfato triplo, fosfato de gafsa, fosfato de itafós e a mistura superfosfato triplo e fosfato de gafsa, superfosfato triplo e fosfato de itafós) e controle (sem fertilizante), com e sem a aplicação de inoculante (*Pseudomonas fluorescens*);
- Verificar a influência da atividade de água na contaminação de milho por fungos toxigênicos nas diferentes cultivares de milho e fertilizações;
- Avaliar a concentração de proteína de diferentes amostras de milho produzidos sob adubação orgânica e mineral, assim como produzido sob diferentes fertilizações fosfatadas, com e sem aplicação de inoculante;
- Verificar a eficiência de sorventes orgânico (β -glucana) e inorgânico (carvão ativado) na remoção de desoxinivalenol *in vitro*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

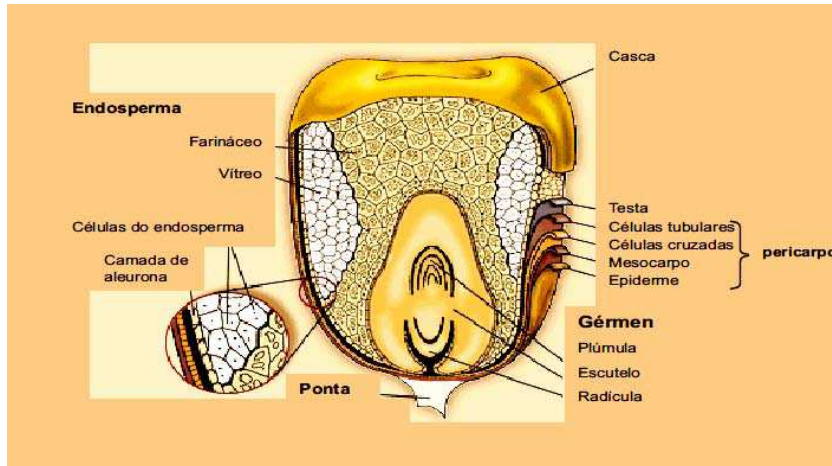
3.1 MILHO

O milho é uma cultura amplamente difundida, devido à facilidade de adaptação aos diferentes ecossistemas. No Brasil, a produção de milho tem sido caracterizada pelo cultivo em duas épocas (EMBRAPA MILHO E SORGO, 2008). Os cultivos de verão, ou primeira safra são realizados de agosto a novembro, período chuvoso, onde os riscos climáticos e o potencial de rendimento são variáveis, enquanto a safrinha, ou segunda safra, tem sido semeada em fevereiro ou março (GERAGE, 2000; SILVA et al., 2001). Por ser implantado no final da época normal, no Estado do Paraná o milho safrinha pode ter sua produtividade bastante afetada pelas limitações de água, radiação solar e temperatura em estágios avançados de desenvolvimento (CRUZ et al., 2010; GONÇALVES et al., 2002), fato que pode favorecer a ocorrência e susceptibilidade de pragas.

No Brasil, a produção de cereais, leguminosas e oleaginosas no ano de 2010 foi de 149,7 milhões de toneladas, um aumento de 8,9 % em relação a 2009 (134,0 milhões de toneladas). A região sul ocupou o primeiro lugar na produção desses grãos, com cerca de 64,1 milhões de toneladas. Quanto ao milho, o Paraná produziu um volume próximo a 13,5 milhões de toneladas nas duas safras de 2010, cerca de 24,2 %, a maior percentagem da produção nacional (IBGE, 2010).

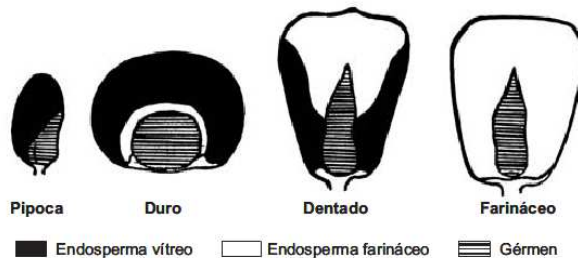
O milho, pertencente à família das *Poacea*, gênero *Zea*, cientificamente denominada *Zea mays* L. (FANCELLI; LIMA, 1982; FORNAZIERI FILHO, 2007), apresenta o grão constituído por quatro principais estruturas físicas, o endosperma, o pericarpo, o pedúnculo ou ponta e o gérmen (Figura 1). A coloração dos grãos é bastante variada, apresentando desde a cor branca ou amarelada até preta ou vermelha. A massa de cada grão varia entre 250 e 300 mg, sendo constituído de amido (72 %), proteínas (9,5 %), fibras (9 %) e óleo (4 %), em massa seca (PAES et al., 2006). Devido à sua constituição, o milho é utilizado em centenas de produtos alimentares como farinha, farelo de milho e milho pipoca. Cerca de 70 % da produção mundial é destinada à alimentação de suínos e aves, como componente da ração. No Brasil essa taxa varia entre 70 a 80 % da produção total (EMBRAPA MILHO E SORGO, 2008).

Figura 1 – Anatomia e morfologia do grão de milho (PAES et al., 2006).



A classificação do milho, fisiologicamente maduro, pode ser realizada de acordo com a textura e aspecto do endosperma do grão (Figura 2). Podem ser descritos como farináceo, dentado, duro, pipoca e doce. O milho duro é o tipo produzido na maior parte do Brasil, enquanto que em países de clima temperado predomina a produção do milho dentado (JUGENHEIMER, 1985; PAES et al., 2006; FORNAZIERI FILHO, 2007).

Figura 2 – Tipos de milho e as relativas proporções do endosperma farináceo e vítreo (PAES et al., 2006).



O grão de milho tipo farináceo é constituído por amido com característica porosa (amiláceo), de baixa densidade e coloração opaca. Nos grãos dentados, as laterais são formadas por endosperma duro ou cristalino, sendo que o endosperma amiláceo está contido apenas no centro do grão. Ao secar, esse endosperma reduz seu volume, formando indentações pelo enrugamento. O milho duro apresenta em quase todo seu volume o endosperma vítreo, sendo a proporção amilácea porosa muito reduzida. O milho pipoca possui as camadas mais externas do endosperma extremamente duras, porém no centro, entre os grãos de amido, encontram-se espaços cheios de ar. Caso forem rapidamente aquecidos, o ar tende a expandir-se, num processo denominado pipocamento. O milho doce quando seco, enruga seu

endosperma e adquire aspecto vítreo devido à cristalização dos açúcares presentes na sua estrutura (FORNAZIERI FILHO, 2007).

A alta qualidade nutricional expõe o milho à contaminação por microrganismos, principalmente fungos toxigênicos como *Fusarium* spp., cujo crescimento é favorecido pelo clima subtropical predominante no Brasil (SYDENHAM et al., 1996). Ao colonizar os grãos, os fungos toxigênicos podem causar danos físicos, reduções nos conteúdos de carboidratos e proteínas, descoloração dos grãos, além de produzir metabólitos secundários tóxicos, denominado micotoxinas (BUIATE et al., 2008). As micotoxinas reduzem a qualidade do grão, que influi diretamente no valor de mercado, necessitando de procedimentos adicionais para reduzir sua contaminação. Em alguns casos de alta contaminação, torna-se mais econômico a destruição da cultura no campo, ao invés de uma colheita de produtos não comercializáveis (VISCONDI, 2001).

3.2 MICOTOXINAS

O termo micotoxinas surgiu em 1960, com a ocorrência de um surto, que causou a morte de milhares de perus na Grã-Bretanha, devido à necrose hepática e hiperplasia biliar. Esse evento ocorreu após o consumo de torta de amendoim importada, no qual posteriormente foi detectada a contaminação com *Aspergillus flavus* produtor da micotoxina cancerígena Aflatoxina B1 (BENNETT; KICH, 2003).

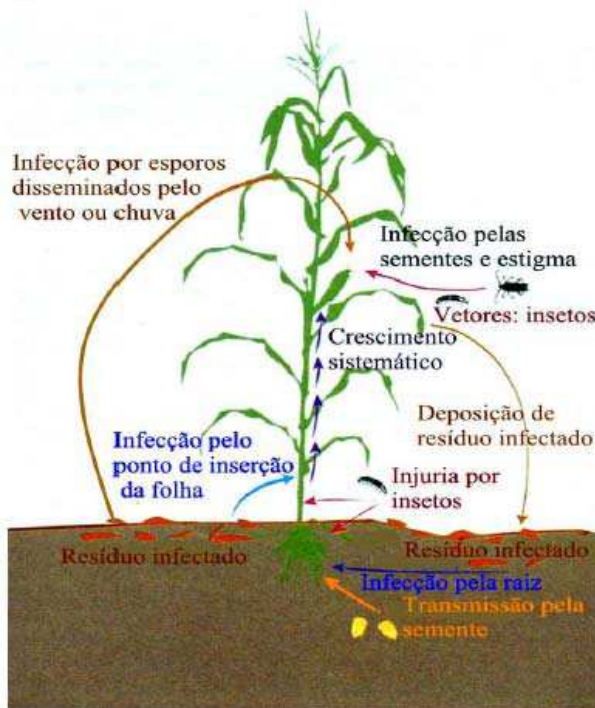
São conhecidos mais de 300 compostos tóxicos produzidos por fungos, que, se desenvolvem em diferentes condições climáticas. Um pequeno grupo desses compostos recebe grande atenção quanto à toxicidade, como os tricocetenos, zearalenona, fumonisinas, aflatoxinas e ocratoxinas (JOUANY et al., 2005; BINDER et al., 2007; BELTRAN et al., 2009). Essas toxinas fúngicas podem ser produzidas principalmente pelos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*.

Espécies de *Fusarium*, *Alternaria* e *Botryosdiplodia* são patógenos de campo que produzem micotoxinas antes ou imediatamente após a colheita, porém geralmente perdem sua viabilidade durante o armazenamento. Por outro lado, as espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*, são mais comumente encontradas como contaminantes de produtos durante o armazenamento, podendo se multiplicar significativamente, dependendo das condições de armazenagem. Em sementes, a contaminação por esses fungos pode induzir à acentuada redução na taxa de germinação (SWEENEY; DOBSON, 1998; BEWLEY; BLACK, 1994).

Fusarium é um gênero amplamente distribuído na natureza, caracterizado como fungo patogênico, responsável por causar infecções que comprometem a integridade fisiológica de muitas plantas de interesse econômico, como o milho e o trigo (JOUANY et al., 2005; BINDER et al., 2007; BELTRAN et al., 2009). Entre as micotoxinas produzidas por esse fungo estão zearalenona, desoxinivalenol e fumonisinas (MARASAS et al., 1991; CAWOOD et al., 1991).

A contaminação de cereais por fungos pode ocorrer no campo, durante o desenvolvimento dos grãos ou no período de colheita, principalmente em períodos chuvosos (VISCONTI, 2001). No campo, *Fusarium* spp. pode estar presente nos resíduos, provenientes de colheitas anteriores, desenvolvendo hifas que prolongarão a sua sobrevivência, porém, poderão infectar sementes e plântulas de milho em desenvolvimento. Em ambiente propício, pode ocorrer a produção de macro e microconídios, que ao entrarem em contato com o vento, chuva ou vetores, poderão ser disseminados, contaminando, colmo, espigas e outras partes da planta, conforme mostrado na Figura 3 (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997).

Figura 3 – Ciclo da infecção da planta de milho por *Fusarium* spp. no campo (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997)



Os problemas relacionados à contaminação por *Fusarium* spp. em grãos incluem a redução da produtividade de grãos das culturas, das taxas de germinação e vigor

das sementes. No produto final, podem ocorrer alterações no sabor e odor, diminuindo a palatabilidade e o consumo de alimentos (VISCONDI, 2001, BÜNZEN; HAESE, 2006).

As condições ambientais e de armazenamento podem contribuir para a produção de micotoxinas por fungos toxigênicos (HUSSEIN; BRASEL, 2001). A temperatura, umidade relativa, umidade do grão ou da ração, bem como a presença de roedores e insetos, propiciam o crescimento fúngico que promovem danos físicos à semente (VICONTI, 2001). A umidade é o principal fator de crescimento fúngico, e conseqüentemente, da deterioração de grãos e rações.

Em grãos de milho, a atividade de água pode influenciar nas interações entre os fungos, na capacidade de produzir esporos, nas atividades metabólicas, bem como na produção de micotoxinas (MAGAN; LACEY, 1988). A umidade de 18 a 20 %, que corresponde a aproximadamente 0,90 a 0,93 de atividade de água, pode propiciar o desenvolvimento de *Fusarium* spp. (RHEEDER et al., 1990). A atividade de água entre 0,95 e 0,96, aliada à temperatura entre 25 e 30°C, podem favorecer a contaminação do grão por *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, assim como a produção de fumonisina B1 e B2 (MARIN et al., 1995). Por outro lado, em atividade de água de 0,85 a 0,86, a produção de fumonisina B₁ não ocorre (CAHAGNIER et al., 1995).

Além dos prejuízos econômicos, as micotoxinas podem causar recusa alimentar, diminuição do peso corporal, imunossupressão, redução da capacidade reprodutiva, efeitos teratogênicos, carcinogênicos e estrogênicos em seres humanos e animais (AKANDE et al., 2006; BINDER et al., 2007).

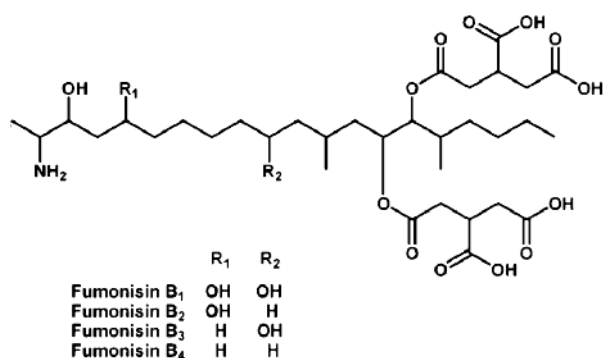
Estima-se a contaminação de 25 % da produção mundial de grãos por algum tipo de micotoxina (HUSSEIN; BRASEL, 2001). No Brasil, perdas econômicas relacionadas a grãos foram avaliadas entre 10 a 25 % da produção total, decorrentes de contaminação por fungos toxigênicos e presença de micotoxinas (PEDROSA; DEZEN, 1991).

3.2.1 Fumonisinas

Fumonisinas são micotoxinas derivadas de policetídeos, produzidas por *F. proliferatum*, *F. anthophilum*, *F. nygamai*, *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici* (BENNETT; KLICH, 2003). Entretanto, *Fusarium verticillioides*, patógeno primário endêmico na cultura do milho, tem sido descrito como o principal produtor de fumonisinas. Estima-se, que 90 % de todo milho do mundo apresente alguma fitopatologia e/ou contaminação relacionada a essa espécie (BACON; NELSON, 1994; MILLER et al., 1995).

A elucidação da estrutura química da fumonisina foi realizada por Bezuidenhout et al. (1988), sendo caracterizada como uma cadeia linear contendo 20 carbonos, com um grupo hidroxila no carbono 3 e grupamentos metil nos carbonos 12, 16 e 20, além de sete radicais distribuídos pela molécula (SEO; LEE, 1998; RHEEDER et al., 2002). Esse composto é fortemente polar, solúvel em água, metanol e acetonitrila:água, e insolúvel em solventes orgânicos apolares (Figura 4) (SCOTT, 1993).

Figura 4 – Estrutura química de fumonisinas (PROCTOR et al., 2006).

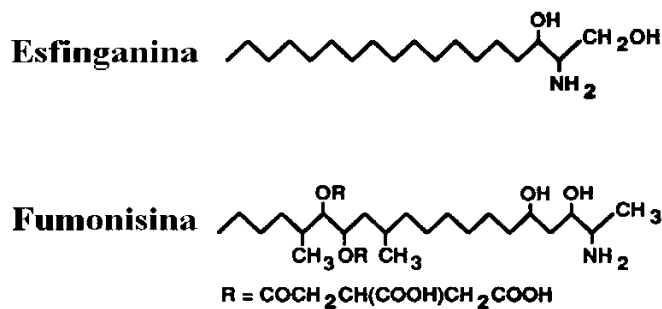


Os análogos de fumonisinas podem ser classificados em quatro grupos denominados A, B, C e P (MUSSEER et al., 1997; RHEEDER et al., 2002). A fumonisina Bi (FBi) é o metabólito mais abundante, representando 70 % das fumonisinas detectadas em alimentos e rações naturalmente contaminados, seguido de fumonisina B₂ (FB₂) e B₃ (FB₃) (GELDERBLOM et al., 1991). Outros análogos de fumonisinas podem ser encontrados em menores concentrações, como a FB₄, A₁, A₂, A₃, AK₁, C₁, C₃, C₄, P₁, P₂, P₃, PH_{1a}, PH_{1b}, isolados a partir de culturas de *Fusarium verticillioides* (BEZUIDENHOUT et al., 1988; YAZAR; OMURTAG, 2008).

A FB₁ pode causar leucoencefalomalacia em eqüinos (KELLERMAN et al., 1990), edema pulmonar em suínos (OSWEILER et al., 1992), hepatocarcinoma (GELDERBLOM et al., 2004) e defeitos no tubo neural em ratos (SADLER et al., 2002) e seres humanos (MARASAS et al., 2003). Algumas alterações hepáticas podem ser detectadas por meio dos parâmetros bioquímicos séricos, com tendência de aumento das enzimas fosfatase alcalina, sorbitol desidrogenase, aspartato aminotransferase e gama glutamil transpeptidase (VISCONTI et al., 1999; GUMPRECHT et al., 2001). Na África do Sul, o consumo de milho contaminado foi relacionado ao surgimento de câncer esofágico em seres humanos (WHO, 2000; SYDENHAM et al., 1990) e na China, ao câncer hepático (UENO et al., 1997).

Vários mecanismos de hepatotoxicidade e carcinogenicidade causados por fumonisinas foram relatados, incluindo acúmulo de ácidos graxos, proliferação celular, estresse oxidativo e peroxidação lipídica. A interrupção da biossíntese de esfingolipídeos por fumonisinas pode estar relacionada com a inibição competitiva da esfingosina N-acetiltransferase (ceramida sintase), devido à similaridade estrutural com a esfinganina, demonstrado na Figura 5 (GELDERBLOM et al. 2001; DU et al., 2008). Acredita-se que a inibição da produção de esfingolipídeos seja responsável pelas doenças fatais causadas pela ingestão de fumonisinas, como a leucoencefalomalácia em eqüinos, edema pulmonar em suínos, defeitos no tubo neural em ratos e câncer esofágico em seres humanos (ZALETA-RIVERA et al., 2006; TURNER et al., 1999).

Figura 5 – Comparação da molécula de fumonisina com a esfinganina (WANG et al., 1992).



Em 1992, a "International Agency for Research on Cancer", classificou a fumonisina B1 como carcinógeno 2B, possivelmente carcinogênico para seres humanos (SUZUKI et al., 2007). No Brasil, ainda não existem limites legais estabelecidos para os níveis de fumonisinas em alimentos (ANVISA, 2007), porém a U. S. Food and Drug Administration (2001), nos Estados Unidos, estabeleceu níveis máximos tolerados em produtos à base de milho destinados à alimentação humana e animal para fumonisinas (FB₁ + FB₂ + FB₃) (Tabela 1).

Tabela 1 – Níveis máximos de fumonisinas totais em milho e derivados recomendados pela USFDA para alimentação humana e animal.

Fumonisinhas Totais (FB₁ + FB₂ + FB₃)	
<u>Milho para consumo humano</u>	
Farelo de Milho	2,0 µg/Kg
Milho pipoca	3,0 µg/Kg
Milho para produção de massas	4,0 µg/Kg
<u>Milho e subprodutos para animais</u>	
Equinos e coelhos	5 µg/Kg < 20 % da dieta
Suínos e coelhos	20 µg/Kg < 50 % da dieta
Ruminantes, aves, gado leiteiro e galinha poedeira	30 µg/Kg < 50 % da dieta
Ruminantes > 3 meses antes do abate	60 µg/Kg < 50 % da dieta
Frangos para abate	100 µg/Kg < 50 % da dieta
Outras espécies de ruminantes e animais de estimação	10 µg/Kg < 50 % da dieta

Fonte: U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (2001).

Em análises de 200 amostras de milho, obtidas das cidades de Várzea -Mato Grosso, Santa Maria - Rio Grande do Sul, Nova Odessa - São Paulo e Campinhos -Bahia, *F. verticillioides* foi detectado em 100 % delas. A FB₁ foi detectada em 98 % das amostras e FB₂ em 74,5 %, com níveis variando de 0,015 a 9,67 µg/Kg para FB₁ e 0,015 a 16 µg/kg para FB₂. A maior contaminação por fumonisinas foi detectada em São Paulo (9,67 µg/Kg) (ROCHA et al., 2009).

Na avaliação de 300 amostras de milho (safra 2003 e 2004) coletadas nas etapas de recepção e pré-secagem de indústrias de processamento da Região norte do Paraná, *Fusarium* spp. foi detectado em 100 %, *Penicillium* spp. em 97,3 % (safra 2003) e 91,1 % das amostras (safra de 2004). O gênero *Aspergillus* apresentou menor frequência, sendo detectado em 37,3 % (safra 2003) e 3,3 % (safra de 2004). A contaminação por fumonisinas (FB₁+FB₂) foi detectada em 100 % das amostras, com níveis médios de 2,54 µg/g (recepção) e 3,12 µg/g (pré-secagem), na safra de 2003. Na safra de 2004 foi detectada a contaminação em 98,9 e 95 % das amostras de milho, nas etapas da recepção e pré-secagem, com níveis de 1,31 µg/g (recepção) e 1,36 µg/g (pré-secagem) (MORENO et al., 2009).

A análise de 74 amostras de alimentos a base de milho, adquiridas no comércio da cidade de Recife, no período de 1999 a 2001, demonstrou a contaminação de

94,6 % das amostras por FB₁ (20 a 8600 µg/kg) e 6,7 % por aflatoxina B₁ (máximo 20 µg/kg) (KAWASHIMA; SOARES, 2006).

Ono et al. (2008) avaliaram a qualidade micotoxicológica do milho recém colhido (n= 870) utilizado pelas indústrias de processamento na região Norte do Estado do Paraná (safra de 2003 e 2004), provenientes da etapa de recepção e de pré-secagem. A contaminação por *Fusarium* spp. foi detectada em 100 % das amostras, *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. em 84,1 % e 5,6 % das amostras na safra de 2003 e em 95,3 % e 19,8 % da safra de 2004, respectivamente. FB₁ foi detectada em todas as amostras analisadas, com níveis variando de 0,02 a 10,98 µg/g (recepção) e de 0,06 a 7,74 µg/g (pré-secagem) na safra de enquanto que na safra de 2004 a contaminação variou de 0,03 a 12,04 µg/g (recepção) e 0,01 e 7,89 µg/g (pré-secagem). Os níveis de FB₂ detectados na safra de 2003 variaram de 0,02 a 5,25 µg/g (recepção) e de 0,01 a 7,89 µg/g (pré-secagem), enquanto que na safra de 2004, de 0,02 a 6,12 µg/g (recepção) e 0,05 a 3,47 µg/g (pré-secagem).

Caldas e Silva (2007), avaliando 208 amostras de 10 produtos derivados de milho, vendidos comercialmente no Distrito Federal do Brasil, detectaram a contaminação de 80,7% e 71,6 % das amostras por FB₁ e FB₂, respectivamente. Os níveis de fumonisinas variaram de 127 µg/Kg a 2.040 µg/Kg.

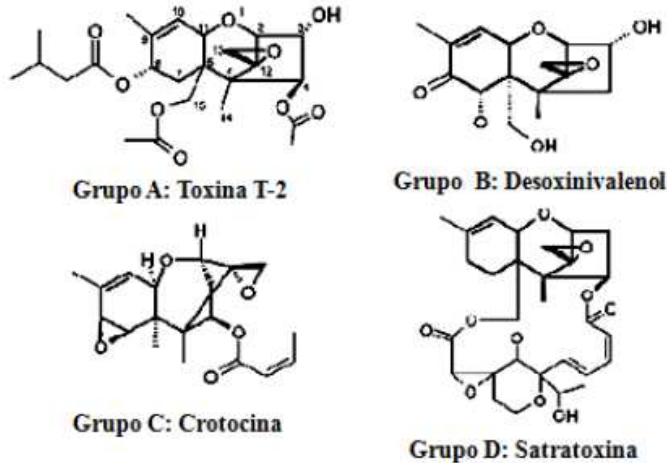
3.2.2 Tricotecenos

Os tricotecenos constituem um grupo de micotoxinas pertencentes ao grupo dos sesquiterpenóides, produzidos por *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* e *F. poae*, *Trichoderma* spp., *Myrothecium* spp., *Stachybotrys* spp., *Cylindrocarpon* spp., e *Trichothecium* spp. (GARBA et al., 2004; SUDAKIN et al., 2003). Ocorrem principalmente em cereais, como milho, aveia, cevada e trigo (YAZAR; OMURTAG, 2008; PESTKA; SMOLINSKI, 2005; MOAZAMI; JINAP, 2009).

O primeiro isolamento de tricotecenos ocorreu no ano de 1949, a partir de *Trichothecium roseum*, descrito por Freeman e Morrison (YAZAR; OMURTAG, 2008). Mais de 180 diferentes derivados de tricotecenos foram isolados, caracterizados e subdivididos em quatro grupos A, B, C e D (Figura 6), sendo os grupos A e B os mais importantes em alimentos (YAZAR; OMURTAG, 2008; PESTKA; SMOLINSKI, 2005; ASAM; RYCHLIK, 2007). Os tricotecenos caracterizam-se pela presença de um anel epóxido nas posições C₁₂ e C₁₃, responsável pela sua toxicidade. A abertura deste anel epóxido (epoxidação), pode

resultar em produtos menos tóxicos para os tipos A ou B (ROCHA et al., 2005; ZHOU et al., 2008).

Figura 6 – Estrutura química dos Tricotecenos A, B, C e D (SUDAKIN, 2003).



Desoxinivalenol (DON), um tricoteceno do tipo B, foi isolado pela primeira vez no Japão a partir de cevada contaminada por *Fusarium* spp., onde foi denominado como "RD-toxina". Posteriormente, o mesmo composto foi isolado a partir de milho e associado ao aparecimento de vômitos em suínos, recebendo o nome de "vomitoxina". Desde então, ocorreram muitos casos confirmados de envolvimento de desoxinivalenol na recusa alimentar ou diminuição da ingestão de alimentos por suínos (MOROOKA et al., 1972).

O DON pode ser produzido por várias espécies de *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium* e *Stachybotrys* (DESJARDINS et al., 1993; KOKKONEN et al., 2010). Essa micotoxina é considerada um contaminante mundial em grãos de cevada, trigo, aveia, milho e seus subprodutos. Mesmo quando consumido em níveis baixos (0,66 mg/Kg), pode gerar sérios problemas relacionados à saúde humana e animal (PESTKA; SMOLINSKI, 2005; ROTTER et al., 1996; PLACINTA et al., 1999; HAFNER et al., 2007).

Quando ingerido, DON é absorvido pelo epitélio intestinal por meio de difusão simples (SERGENT et al., 2006). Os sintomas de contaminação incluem alterações hematológicas, hemorragias de tecidos internos, imunossupressão, irritações na pele, vertigens, problemas gastrintestinais, como vômitos, náuseas e diarreia (BINDER, 2007).

DON pode causar a redução do consumo de ração em animais, sendo que este fato pode estar relacionado com a diminuição da síntese de proteína hepática, que resulta em uma hiperaminoacidemia, provocando conseqüentemente elevados níveis de triptofano no

sangue. Triptofano é o precursor da serotonina e elevadas concentrações de serotonina podem resultar na redução do apetite (LEATHWOOD, 1987).

Sergent et al. (2006) relataram a inibição da divisão das células intestinais em até 50 % na concentração de 0,66 µg/mL de DON. Esse efeito provavelmente ocorre pela inibição da síntese de RNA e DNA, conseqüentemente, inibição da síntese protéica.

Estudos indicam que a utilização de cereais contaminados na alimentação de galinhas poedeiras pode resultar na transferência de pequenas quantidades de DON para os ovos (SYPECKA et al., 2004; VALENTA; DANICKE, 2005). Em suínos, níveis de 10 ng/g de DON podem ser detectados nos tecidos após o consumo prolongado (três a sete semanas) de alimentos contaminados (PRELUSKY; TRENHOLM, 1997).

Existem poucas pesquisas sobre a toxicidade de DON em seres humanos, as quais se limitaram às doenças gastrintestinais e distúrbios imunotóxicos. Bensassi et al. (2009) avaliaram o efeito da toxicidade de DON sobre a morte celular programada ou apoptose, utilizando cultura de células humanas. DON (10 µM) induziu lesões diretamente no DNA da célula humana e poderia, portanto, ser considerado um agente genotóxico.

Os limites de DON em grãos ou subprodutos estabelecidos por países como Romênia, Estados Unidos, Austrália, Canadá e a Comunidade Européia estão demonstrados na Tabela 2. No Brasil ainda não existem limites máximos tolerados para essa micotoxina.

A contaminação por DON em amostras de trigo (50 amostras de origem nacional proveniente dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul e 50 amostras importadas da Argentina e Paraguai) foi avaliada por Calori-Domingues et al. (2007). DON foi detectado em 94 % das amostras de trigo nacional (média 332 µg/Kg) e 88 % do trigo importado (90 µg/Kg). Em 4 % das amostras de trigo nacional a contaminação por DON foi superior ao limite máximo permitido pela Comunidade Européia (1.000 µg/kg).

Prado et al. (1997), avaliando 115 amostras de milho pós colheita de diferentes localidades do Brasil, Argentina e Paraguai (safra de 1994/1995), detectaram DON em 6 % das amostras, com níveis entre 102 e 542 µg/Kg.

No Estado de São Paulo, foi detectada a contaminação por desoxinivalenol (média 71 µg/Kg) e nivalenol (média 106 µg/Kg) em 6 % das amostras de grãos de milho analisadas (n=80) (MILANEZ; VALENTE-SOARES, 2006). Em Minas Gerais, das 47 amostras de grãos de trigo, farelo de trigo e produtos de panificação coletadas em supermercados de algumas cidades, 68 % estavam contaminadas com DON, com níveis variando de 40 a 1.205 µg/Kg (OLIVEIRA et al., 2002).

Tabela 2 – Limites máximos tolerados para desoxinivalenol em grãos, alimentos processados e rações.

Pais	Produto	µg/Kg
Comunidade Europeia	Cereais não processados, exceto trigo duro, aveia e milho	1250
	Trigo duro e aveia não processados	1750
	Milho não processado, exceto milho seco	1750
	Farinha de cereais, incluindo farinha de sêmola de milho	750
	Massas Alimentícias (secas)	750
	Pães, bolos, biscoitos, salgados a base de cereais e cereais consumidos no café da manhã	500
	Alimentos a base de cereais para lactantes e crianças	200
	Trigo para consumo humano	1000
	Grãos destinados a suínos	1000
	Grãos destinados a outros animais (exceto gado e frango)	2000
Rússia	Grãos e subprodutos de grãos destinados ao gado em confinamento com idade superior a 4 meses	5000
	Grãos e subprodutos para Frangos	5000
Rússia	Cereais, farinha e farelos	1000
Canadá	Ração para Gado e Aves	5000
	Ração para suínos, novilha e animais em lactação	1000
Bélgica	Cereais e subprodutos para alimentação animal	5000
Romênia	Rações em geral	5
	Ração para suínos	500
Áustria	Gado de corte, galinhas poedeiras e matrizes	1000
	Aves para corte	1500

Fonte: Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO (2001).

Em 19 amostras de grãos de trigo coletadas nos Estados do Rio Grande do Sul e Paraná, foram detectados níveis médios de contaminação por DON entre 309,41 µg/Kg e 640,06 µg/Kg, sendo que no Rio Grande do Sul, 15 % das amostras apresentaram contaminação superior ao limite máximo estabelecido pela Comunidade Europeia (1.000 Mg/kg) (SANTOS et al., 2008).

Apesar de DON pertencer ao grupo dos tricotecenos menos tóxicos, a sua detecção é de grande importância para o controle de qualidade de alimentos. A presença desta toxina pode ser utilizada como indicador de possível presença de outros tricotecenos mais tóxicos (MOAZAMI; JINAP, 2009).

3.3 CONTROLE DE MICOTOXINAS PRÉ E PÓS COLHEITA

Devido à ampla distribuição de fungos toxigênicos e os efeitos prejudiciais de micotoxinas no metabolismo de seres humanos e animais, a prevenção, controle e detoxificação de alimentos contaminados são considerados de suma importância (BIAGI, 2009; ZHOU et al., 2008).

Bünzen e Haese, (2006) e Mallmann (2006) abordaram algumas estratégias para minimizar a contaminação de grãos e produtos com micotoxinas, entre elas estão a seleção de cultivares resistentes à contaminação por fungos; a aplicação de práticas que reduzam o desenvolvimento de fungos no campo; os cuidados durante a colheita para evitar a quebra dos grãos; a secagem adequada dos grãos colhidos; o controle de exposição dos grãos a altos graus de umidade; a manutenção de instalações de armazenagem de rações que impeçam a presença de roedores e insetos; testes de rotina para detecção de micotoxinas e a utilização de sorventes em rações e matérias-primas contaminadas com micotoxinas.

A principal estratégia para minimizar a contaminação de cereais por micotoxinas é a boa prática agrícola, seguido de boas práticas na manipulação, processamento, armazenamento e distribuição dos cereais para alimentação humana e animal. Entretanto, as estratégias pré e pós-colheita das culturas de grãos, dependem em grande parte, das condições climáticas (AWAD et al., 2010).

3.3.1 Cultivares de Milho

Um bom rendimento do milho requer primeiramente, a escolha do genótipo adequado, pois a cultivar é responsável por 50 % do rendimento final. Deve-se avaliar a adaptabilidade da cultivar à região, produtividade e estabilidade, ciclo, tolerância às principais doenças comuns na região, qualidade do colmo e raiz, sanidade, textura e cor do grão (EMBRAPA MILHO E SORGO, 2008).

As características nutricionais dos grãos de milho expõem-no à contaminação por fungos. Esses microrganismos ao se desenvolverem, deterioram os grãos, acarretando perda nutricional. Os genótipos de grão mole e com mau empalhamento da espiga, aliados à variação do microclima (temperatura e alta taxa de precipitação pluviométrica no período de colheita), podem favorecer a contaminação fúngica dos grãos de milho. A incidência de fungos, principalmente toxigênicos, é motivo de preocupação quanto à saúde humana e animal. Portanto, torna-se imprescindível a identificação de materiais

genéticos resistentes à infecção fúngica, capazes de prevenir a contaminação por micotoxinas (PINTO et al., 2007).

Diferenças quanto à contaminação fúngica e micotoxinas podem estar relacionadas à influência do genoma da planta na expressão da biossíntese da micotoxina (MALLMAN, 2007). Estudos realizados em 36 cultivares de milho, em relação à presença de grãos ardidos e mofados na fase pré-colheita e a contaminação de fumonisina por *Fusarium*, demonstraram diferenças significativas na interação entre as cultivares e o fungo. Milhos híbridos AG 8014, CD3121, Z 84 e Z 8486 apresentaram menores percentagens de grãos ardidos e visualmente mofados, bem como de contaminação por fumonisina B₁ do que outros híbridos avaliados (PINTO et al., 2007).

3.3.1.1 Milho crioulo

Milho crioulo ou *Landraces* são raças locais que possuem ampla variabilidade genética, demonstrando maior adaptabilidade e estabilidade em relação aos híbridos, sendo considerada uma opção para cultivos com baixo investimento tecnológico (NASS; PATERNIARI, 2000).

Esse tipo de cultivar de milho é capaz de suportar melhor os estresses abióticos e bióticos, como água, nutrientes, temperatura e pragas, além de permitir que o agricultor produza sua própria semente (ROMANO et al., 2007).

As espigas do milho crioulo são caracterizadas por serem bem empalhadas, dificultando a infestação de pragas, como carunchos. Essas cultivares podem ser cultivadas em solos com menor disponibilidade de nutrientes. Entretanto, o porte elevado e a inserção alta da espiga, podem prejudicar a colheita e favorecer o quebraamento e acamamento das plantas. Outro fator negativo é a baixa produtividade, quando comparada com cultivares melhoradas (NASS; PATERNIARI, 2000; VIOLA, 2003).

3.3.1.2 Variedade de polinização aberta (VPA)

A variedade pode ser definida como um conjunto de plantas com características comuns, material genético estável e de alta variabilidade (HORN et al., 2006; ARGENTA et al., 2003). Essa cultivar melhorada apresenta resistência a fatores abióticos (tolerância a seca, alumínio e nutrientes), potencial produtivo superior às variedades crioulas, porém, inferior ao dos híbridos (EMYGDIO; PEREIRA, 2006).

O cultivo de milho VPA é o preferido pelos agricultores, principalmente os que cultivam em sistema orgânico, devido ao menor custo das sementes e a possibilidade de produzir a própria semente para as plantações seguintes (HEMP et al., 2009; EMBRAPA MILHO E SORGO, 2008). Diferente dos híbridos, as VPAs não apresentam redução do potencial produtivo, quando semeadas na safra seguinte (Indicações, 2001).

3.3.1.3 Milho híbrido

Híbridos simples podem ser obtidos a partir do cruzamento de duas linhagens endogâmicas, expressando alta uniformidade genética. As sementes de milho híbrido resultam em alta produtividade e vigor somente na primeira geração, denominada F1 (EMBRAPA MILHO E SORGO, 2008). Caso as sementes colhidas dessa geração (F2) forem semeadas, haverá redução de 15 % a 40 % da produtividade dependendo do tipo de híbrido, devido à perda de vigor e variação entre as plantas. Para evitar essas perdas é necessário a obtenção de novas sementes a cada safra.

Milhos híbridos apresentam níveis de resistência diferenciados aos fungos causadores de podridão na espiga, como *Fusarium*, embora fatores como rotação de culturas, adubação de nitrogênio (N) e potássio (K) equilibrada e controle dos insetos-praga possam influenciar o seu comportamento. Uma das características positivas de alguns híbridos é a presença de espigas decumbentes, ou seja, espigas que viram a ponta para baixo, logo após a maturação fisiológica. Elas podem evitar a penetração de água, conferindo às espigas menor umidade e ambiente não propício ao crescimento fúngico, além de apresentar maior resistência a podridões e quebra de colmo (FORNAZIERI FILHO, 2007).

3.3.2 Adubação

3.3.2.1 Adubação mineral

A cultura do milho é uma das mais exigentes em fertilizantes, principalmente nitrogenados, que atuam durante o estágio inicial de crescimento da plântula de milho, no desenvolvimento da parte aérea e radicular (FORNAZIERI FILHO, 2007). Uma nutrição balanceada com micro e macronutrientes pode proteger as plantas contra contaminação fúngica, entretanto a deficiência desses nutrientes pode ocasionar o

desenvolvimento de doenças, diminuição da produtividade e favorecer a produção de micotoxinas (REID et al., 1999; HASSEGAWA et al., 2006).

A maior parte do nitrogênio (N) presente no solo provém de materiais orgânicos (proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos e nucleotídeos), que sofrem transformações bioquímicas como amonificação (incorporação da matéria orgânica por microrganismos e liberação de amônio) e nitrificação (oxidação do amônio a nitrito e nitrato). Após incorporado à planta, este macronutriente é utilizado na biossíntese de enzimas, coenzimas, clorofila e ácidos nucléicos (TANAKA et al., 1997).

A adubação nitrogenada geralmente aumenta o teor de proteína no grão, que pode reduzir o seu valor biológico, por aumentar os teores de fração protéica (zeína) pobre em aminoácidos essenciais, principalmente triptofano e lisina. O excesso de fornecimento de nitrogênio aumenta a síntese de proteínas na planta e a formação de novos tecidos. A maior parte da energia produzida pela planta é utilizada na elaboração de proteínas e aminoácidos, como consequência, os tecidos apresentam coloração verde-escura e consistência mais tenra, aumentando o perigo de acamamento (modificação da posição do colmo em relação à posição original), susceptibilidade a fatores climáticos e doença foliares (GOMES et al., 2010; FORNAZIERI FILHO, 2007).

O efeito de diferentes fertilizantes nitrogenados (uréia e fertilizante com liberação lenta de nitrogênio) e a dose de nitrogênio aplicado (0 a 400 Kg/ha) foram avaliados sobre a suscetibilidade de um híbrido de milho no desenvolvimento de doenças e na contaminação por micotoxinas (BLANDINO et al., 2008). Altas e baixas concentrações de adubação nitrogenada provocaram um aumento na contaminação por *Fusarium* spp. e na produção de fumonisina B1, devido ao estresse provocado na planta, sugerindo que a aplicação equilibrada (200 Kg ha⁻¹) pode reduzir as taxas de contaminação.

Hassegawa et al. (2008) avaliaram o efeito da aplicação de diferentes doses de nitrogênio (0, 50 e 100 kg/ha), zinco (0,0, 0,5 e 1,0 kg/ha) e boro (0,0, 0,5 e 1,0 kg/ha) sobre a contaminação de milho (72 amostras) por fungos e fumonisinas. Foi detectada a contaminação de 72 % e 27 % das amostras por *Penicillium* spp. e *Fusarium verticillioides*, respectivamente. FB1 (0,3 a 24,3 µg/Kg) foi detectada em 100 % das amostras, enquanto que 93 % das amostras apresentaram contaminação por FB2 (0,05 a 5,42 µg/Kg). A aplicação de nitrogênio (50 Kg/ha) em combinação com boro (0,5 Kg/ha) aumentou a contaminação por FB2.

Arino et al. (2009) avaliaram o efeito de diferentes práticas agrícolas sobre a contaminação de milho por fumonisinas, entre elas, a utilização de sementes convencionais e

transgênicas (resistente à infestação por insetos) e a adubação nitrogenada (entre 150 e 336 Kg/ha). A contaminação de fumonisinas no milho convencional (429 a 729 ug/Kg) foi maior que no milho transgênico (121 a 395 ug/Kg), esta diferença de contaminação pode estar relacionada com a diminuição dos danos causados na planta por insetos, que reduzem conseqüentemente a contaminação por *Fusarium* spp. A aplicação de altas doses de fertilizantes nitrogenados na cultura aumentou a contaminação por fumonisinas (687 ug/Kg), quando comparados com tratamentos sem este tipo de adubação (345ug/Kg).

O potássio (K) é absorvido pela planta na forma de íon K⁺, apresentando papel fundamental na fotossíntese, na neutralização de ânions orgânicos e inorgânicos e na estabilização do pH da planta entre 7,0 e 8,0, faixa ótima para a maioria das reações enzimáticas. No milho, a deficiência de potássio pode ser observada por meio do aparecimento de clorose nas pontas e nas margens das folhas mais velhas, seguidas de necrose e dilaceração do tecido, colmos, com internódio mais curto, maior incidência de apodrecimento da raiz e colmo. O excesso manifesta-se pela carência de magnésio induzida. Depois do nitrogênio, o potássio é o nutriente absorvido em maior quantidade pelo milho (EMBRAPA E SORGO, 2008; FORNAZIERI FILHO, 2007).

As fontes de fósforo podem ser classificadas em solúveis, pouco solúveis e insolúveis. As fontes solúveis, quando adicionadas ao solo, aumentam rapidamente a concentração do fósforo na solução do solo, porém têm sua eficiência diminuída ao longo do tempo devido ao processo de "sorção" ou "fixação" de fosfato. Fosfatos insolúveis (naturais) em água dissolvem-se lentamente na solução do solo e tendem a aumentar a disponibilidade do P para as plantas com o tempo (KORNDÖRFER et al., 1999). Fosfatos mais solúveis proporcionam maior resposta no ano de aplicação, enquanto que os fosfatos naturais tem menor eficiência inicial, entretanto com o tempo, as diferenças entre as fontes tendem a diminuir (HOROWITZ; MEURER, 2003; SOUSA; LOBATO, 2003). Na planta, o fósforo está presente em quantidades menores do que o nitrogênio e o potássio. Ele desempenha papel fundamental na transferência e na utilização de ATP, além de ser constituinte de vários compostos vitais ao metabolismo vegetal como fitina, lecitina e nucleotídeos. Este nutriente é exigido pela planta durante todo ciclo da cultura e quando ocorre a deficiência, a planta apresenta crescimento retardado, com colmos e folhas apresentando coloração arroxeada. Na fase reprodutiva, ocorre deficiência na formação de espigas, falhas nas fileiras de grãos, maturação retardada e desuniforme (FORNAZIERI FILHO, 2007).

Baixos níveis de fósforo podem diminuir a síntese de fosfolipídios das raízes das plantas, resultando em aumento da permeabilidade da membrana celular e

exsudação radicular, influenciando na incidência de patógenos, enquanto que altos níveis podem reduzir a contaminação (ZAMBOLIM et al. 2005). Fidelis et al. (2007) avaliaram a suscetibilidade de híbridos de milho a *Phaeosphaeria maydis*, cultivados em solo com diferentes níveis de fósforo (25 e 113Kg/ha de P_2O_5) no sul do Estado do Tocantins. As doses elevadas de fósforo (113Kg/ha de P_2O_5) não promoveram o aumento da incidência de *P. maydis*.

Okoth e Siameto (2010) avaliaram a eficácia do manejo do solo sob a contaminação da raiz do milho e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) por *Fusarium* spp. Foram realizados tratamentos com Superfosfato Triplo combinado com Nitrato de Cálcio do Amônio (SFT+NCA), Mavuno (mistura de fertilizantes contendo 11 nutrientes), fertilizantes fosfatados (Mijingu), esterco de boi e revestimento de sementes com *Trichoderma* spp. Os tratamentos com fertilizante Mavuno, seguido do SFT+NCA apresentaram menor contaminação por *Fusarium* spp. na raiz e no solo.

3.3.2.2 Adubação orgânica

Os fertilizantes orgânicos contêm vários nutrientes minerais especialmente nitrogênio, potássio e fósforo, embora as concentrações sejam baixas, deve-se considerar o efeito benéfico que exercem após a aplicação. Quando adicionada ao solo, a matéria orgânica libera gradativamente os nutrientes por meio da decomposição natural, que por sua vez é influenciada pela umidade e temperatura. Este tipo de adubação contribui para a redução de lixiviação, fixação e volatilização dos nutrientes, como também redução da fitotoxicidade do alumínio (Al) e manganês (Mn), devido à complexação com a fração húmica e o aumento do pH (ZECH et al., 1997). Atua ainda como regulador da temperatura e fornece produtos da decomposição orgânica que favorecem o desenvolvimento da planta (FORNAZIERI FILHO, 2007).

O aumento da população microbiana no solo devido à aplicação de fertilizante orgânico pode ter papel importante na supressão do desenvolvimento de patógenos da cultura de milho no campo, como *Fusarium verticillioides*, responsável pela doença do colmo e produção de micotoxinas (OSUNLAJA, 1990).

Entre os fertilizantes orgânicos, os esterco (fertilizantes animais) constituem um dos melhores métodos de adubação de culturas e manutenção da matéria orgânica do solo. A composição do fertilizante varia de acordo com o tipo e a idade do animal e com o alimento consumido. As quantidades normalmente aplicadas estão entre 10 a 100 t

ha⁻¹ de esterco bovino e um quarto dessa quantidade de esterco de galinha. Os dejetos podem suprir, parcial ou totalmente, o fertilizante químico na produção de grãos (MENEZES et al., 2002).

Além dos dejetos de galinha, o uso da cama de frango como fertilizante orgânico constitui uma alternativa promissora para aplicação em culturas de milho (SANTOS et al., 2009). A cama de frango é composta por todos os resíduos que se depositam no piso do aviário, incluindo fezes das aves, detritos de rações e fragmentos de material sólido e orgânico. Constitui uma fonte de nitrogênio não proteico de baixo custo e disponível em grandes quantidades, quando comparado a outros tipos de esterco, como demonstrado na Tabela 3 (EL FARESI, 1995).

Tabela 3 – Composição média dos estercos suínos, bovinos e frangos.

Esterco	Kg/m ³ ou toneladas				
	pH	MS (%)	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
Suíno (líquido integral)	7,2 – 7,8	1,3 – 2,5	1,6 – 2,5	1,2 – 2,0	1,0 – 1,4
Suíno (líquido separado)	7,0 – 7,5	0,1 – 0,3	0,7 – 0,9	0,3 – 0,5	0,6 – 0,8
Bovino (chorume)	7,0 – 7,5	10 – 15	1,5 – 2,5	0,6 – 1,5	1,5 – 3,0
Bovino (fezes+urina)	6,8 – 7,5	12 – 15	4,5 – 6,0	2,1 – 2,6	2,8 – 4,5
Bovino (sólido)	7,0 – 7,5	45 - 70	15 - 25	8 - 12	8 - 15
Aves (cama de frango)	6,0 – 7,5	65 - 90	24 - 40	20 - 35	18 - 35

MS= Massa seca, N= Nitrogênio, P₂O₅= Pentóxido de fósforo, K₂O= Óxido de Potássio.

Fonte: EMBRAPA MILHO E SORGO, 2008.

3.3.2.3 Inoculantes

Um considerável número de espécies de bactérias que estão associadas à rizosfera da planta (região do solo sob influência das raízes) exercem grande benefício para o seu crescimento. Entre elas podem-se citar *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Erwinia*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter* e *Flavobacterium* (RODRIGUES; FRAGA, 1999).

A interação entre o microrganismo e a rizosfera pode influenciar no crescimento da planta por meio da síntese de fitormônios, fixação de nitrogênio, bem como a solubilização do fosfato inorgânico e mineralização da matéria orgânica fosfatada, tornando o fósforo disponível para absorção. Outros efeitos incluem a redução ou prevenção dos efeitos deletérios de microrganismos patogênicos, principalmente devido à síntese de substâncias antimicrobianas ou sideróforas (compostos de baixa massa molecular, quelantes de ferro,

produzidos pelas bactérias sob condições limitantes desse elemento) (RODRIGUES; FRAGA, 1999).

A prática de aplicação de microrganismos na cultura pode contribuir com a redução do consumo de fertilizantes fosfatados de alto custo (KUCEY et al., 1989). A utilização de *Azobacter corooococum*, *Azospirillum rasilens*, *Pseudomonas putida* e *Bacillus lentus*, juntamente com a aplicação de fertilizantes convencionais, como NPK, podem melhorar o número de grãos por fileira e, conseqüentemente, o peso das espigas de milho, além de reduzir a aplicação de P em até 50 %, sem ocorrer a redução do rendimento do grão (YAZDANI et al., 2009).

A combinação de *Pseudomonas fluorescens* EM85 e *Bacillus* MR11 suprimiram eficientemente a invasão de patógenos do milho, como *F. verticillioides*, *F. graminearum* e *Macrophomina phaseolina in vitro*. Esse biocontrole pode estar relacionado não somente às substâncias antimicrobianas produzidas por ambos microrganismos aplicados, mas também ao pigmento fluorescente, produzido por *Pseudomonas* (PAL et al., 2001).

Afzal e Bano (2008) constataram que a inoculação de *Pseudomonas* spp. e *Rhizobium leguminismarum*, juntamente com uma fonte de fertilizante superfosfato simples (P2O5) na cultura do trigo, aumentou significativamente o crescimento da raiz, altura da planta, comprimento das espigas, rendimento dos grãos, teor de fósforo nas sementes e teor de carboidratos das folhas, proporcionando rendimento 30 a 40 % superior, quando comparado com o tratamento somente com a fonte de fertilizante fosfatado.

Shaharoon et al. (2008) relataram que a inoculação de *Pseudomonas* spp., combinada com doses adequadas de fertilizantes resulta em melhor desenvolvimento da planta. A inoculação de *P. fluorescens* no cultivo de tomates reduziu a contaminação por *Fusarium* spp. em 30 a 65 %, comparado ao controle, sendo possivelmente a redução da contaminação atribuída à competição entre os microrganismos, tanto por nutrientes, como pela colonização da raiz hospedeira. Porém o mecanismo de ação não foi totalmente esclarecido (LARKIN; FRAVEL, 1998).

3.3.3 Controle de Contaminação na Colheita e Armazenagem

Durante a colheita, é de suma importância a utilização de equipamentos adequados e ajustados corretamente a fim de evitar danos físicos nos grãos, uma vez que quando danificados, eles ficam predispostos à contaminação durante o armazenamento. Outro fator a se considerar é o retardamento da colheita, que pode favorecer a contaminação dos

grãos por *Fusarium* spp. Uma alternativa é a colheita precoce, seguida de secagem do milho, que pode auxiliar no controle da contaminação (AWAD et al., 2010).

Para manter a qualidade do grão, a temperatura de secagem não pode ultrapassar 44°C em sementes, 55° C para grãos destinados a indústrias e 82°C para milho destinado à fabricação de ração (SANTOS, 2006). A umidade final deve estar menor que 15 % para o armazenamento seguro dos grãos (JOUANY et al., 2007).

No armazenamento, a preservação da qualidade dos grãos colhidos é um aspecto fundamental a ser considerado. Os esforços despendidos na fase de produção e colheita podem não ser efetivos, se a qualidade dos grãos não for mantida (OLIVEIRA et al., 1999). A contaminação das sementes por fungos, além de reduzir a taxa de germinação, podem diminuir os valores nutricionais de carboidratos, proteínas e lipídeos dos grãos (BHATTACHARY; RAHA, 2002).

A interação entre os fenômenos químicos, físicos e biológicos podem contribuir com as transformações, deteriorações e perdas de grãos durante o armazenamento. Exercem grande influência os fatores temperatura, umidade, disponibilidade de oxigênio, microrganismos, insetos, roedores e pássaros (SANTOS, 2006).

A temperatura, umidade do ambiente e umidade do grão podem contribuir para a ocorrência de insetos e fungos durante o armazenamento. Desta forma, a estabilidade destes fatores é fundamental para o controle preventivo de pragas (SANTOS, 2006). O armazenamento de grãos em silos é uma alternativa, pois além de ser um bom isolante térmico, podem manter os grãos secos, de modo a evitar a sua deterioração (JOUANY et al., 2007).

Roedores e pássaros podem ser atraídos pelas porções de grãos derramados próximos ao local de armazenamento, levando ao estabelecimento de populações capazes de invadir o ambiente de armazenagem, causando sérios danos ao sistema de embalagem, e conseqüentemente a contaminação do produto. A limpeza e conservação do local de armazenagem podem reduzir essa infestação (FARONI; SILVA, 2008).

3.3.4 Métodos de Detoxificação

A detoxificação de alimentos contaminados com micotoxinas refere-se ao tratamento pós-colheita para remover, destruir ou reduzir o efeito tóxico (MALLMANN et al., 2006). Várias estratégias de controle têm sido aplicadas na detoxificação de micotoxinas em alimentos, como métodos biológicos, químicos e físicos.

Métodos de descontaminação biológicos podem ser realizados por meio de microrganismos ou suas enzimas, que degradam ou transformam as toxinas em produtos metabólicos menos tóxicos (SWEENEY; DOBSON, 1998; BATA; LÁSZTITY, 1999).

Tratamentos químicos incluem a aplicação de ozônio, compostos alcalinos ou extração com solventes. Este tratamento reduz quase que totalmente a contaminação por micotoxinas no alimento, porém causam perdas de alguns nutrientes, além do risco da formação de outros compostos tóxicos durante a detoxificação (BATA et al., 1999).

Os métodos físicos podem ser considerados a maneira mais simples de detoxificação de alimentos (JOUANI, 2007), podendo ser realizados por meio da inativação pelo calor, moagem, separação por densidade ou irradiação (MALLMANN et al., 2006; RUSTOM, 1996).

O sucesso limitado dos tratamentos físicos e químicos em alimentos levaram à procura de outras alternativas para minimizar o perigo de micotoxinas (AWAD et al., 2010). Desta forma, técnicas como a utilização de sorventes foram estudadas com base na sorção de micotoxinas diretamente no trato gastrointestinal de animais *in vivo*. A utilização de materiais sorventes é uma alternativa promissora, quando a contaminação por fungos toxigênicos é inevitável (LOPES et al., 2009).

3.3.4.1 Sorventes

Os sorventes atuam como seqüestradores, formando ligações com as moléculas de micotoxinas no trato gastrintestinal e reduzem o grau de absorção da micotoxina pelo intestino, diminuindo desta forma, a toxicidade sistêmica no organismo (SEKIYAMA et al., 2007; HUWIG et al., 2001; YIANNILOURIS et al., 2006).

A eficiência da ligação entre o sorvente e a toxina, depende das propriedades químicas e físicas de ambas as moléculas (AVANTAGGIATO et al., 2004). Devido a essas diferenças de parâmetros físicos e químicos, torna-se importante o estudo da eficácia de cada material sorvente (HUWIG et al., 2001).

3.3.4.2 Tipos de sorventes

Os sorventes podem ser classificados como polímeros orgânicos e inorgânicos. Os polímeros inorgânicos são baseados em silicatos, como zeólitas, aluminossilicato de sódio e cálcio hidratado (HSCAS), bentonitas, carvão ativado e terra

diatomácea. Os polímeros orgânicos são derivados de vegetais fibrosos (casca de aveia, farelo de trigo e fibras de alfafa), celulose, hemicelulose, pectina e extratos de parede celular de leveduras (SMITH, 2008; DENLI e PÉREZ, 2007; SABATER-VILAR, 2007; WHITLOW et al., 2006). Alguns sorventes e as percentagens de sorção de algumas toxinas estão representados na tabela 4.

Zeólitas são cristais hidratados de aluminossilicatos, com estrutura porosa que adsorvem principalmente compostos polares com alta seletividade, além de possuir capacidade hidratante e desidratante sem alteração na estrutura química (MUMPTON, 1999).

O aluminossilicato de Cálcio e Sódio Hidratado (HSCAS) é um tipo de montmorillonita constituído por camadas cristalinas e possuem propriedades físico-químicas semelhantes a zeólitas. Ambos podem ser aplicados na sorção de micotoxinas (HUWIG, 1999; PAPAIOANNOU et al., 2005).

Carvão ativado é um composto formado pela pirólise (decomposição em altas temperaturas) da matéria orgânica. Possui pouca solubilidade e muitos poros em sua estrutura (EDRINGTON, et al., 1997; HATCH ET AL., 1982). A sua capacidade adsortiva tem sido utilizada desde o século 19, como antídoto contra envenenamento. Em solução aquosa pode adsorver grande quantidade de micotoxinas eficientemente, entretanto, pela falta de seletividade de sorção, alguns nutrientes essenciais (minerais e vitaminas) podem ser adsorvidos e eliminados neste processo.

Tabela 4 – Sorção *in vitro* de micotoxinas por diferentes sorventes orgânicos e inorgânicos.

Sorvente	Micotoxina	Percentagem de Sorção (%)	Referências
Carvão Ativado		99.9	
Colestiramina		64.9	
Mananas (<i>S. cerevisiae</i>)	DON*	84.6	Cavret et al., 2009.
β - glucana de algas		81.1	
β - glucana de fungos		80.0	
Zeolitas		2	
Glicomananas		1	
Bentonina	DON**	2	Avantaggiato et al., 2004
Celite		1	
Mycosorb		3	
Carvão Ativado	FB ₁ **	100	Avantaggiato et al., 2005.
	ZEA**	100	
	DON**	95	
	NIV**	63	
Glicomanana	FB ₁ **	10	
	ZEA**	11	
	DON**	1	
	NIV**	3	

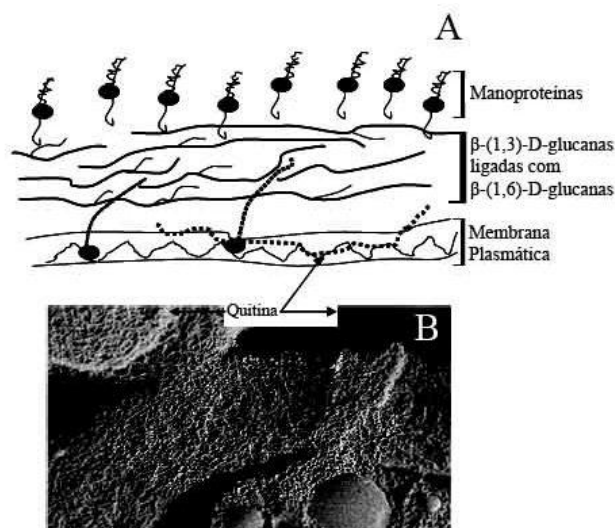
FB₁ = Fumonisina B₁ DON = Desoxinivalenol ZEA= Zearalenona NIV= Nivalenol
 * = 1 μ M de toxina ** = 2 μ g/ml de toxina

Outros problemas relacionados à aplicação prática de carvão ativado em alimentos foram relatados por Sabater-Vilar et al. (2007), como a formação da poeira e coloração escura que pode interferir na aparência do alimento. Este problema pode ser minimizado por meio da mistura de carvão ativado com β -glucana de levedura, que além de atuar como sorvente pode exercer efeitos benéficos sobre o sistema imunológico do animal, estimulando a atividade antitumoral e antimicrobiana do organismo (BROWN; GORDON, 2001).

Os principais componentes das paredes celulares fúngicas são polissacarídeos e glicoproteínas, formados por moléculas de β -(1,3)-D-glucanas com alto grau de polimerização, ramificado com cadeias laterais lineares de β -(1,6)-D-glucanas. A estrutura tridimensional das β -D-glucanas é formada por espirais aleatórios ou conformações mais organizadas compostas por várias cadeias de simples hélice, agrupadas densamente em forma de tripla hélice e estabilizadas por ligações de hidrogênio inter ou intra-moleculares, conforme demonstrada na figura 7 (KOLLÁR et al., 1997).

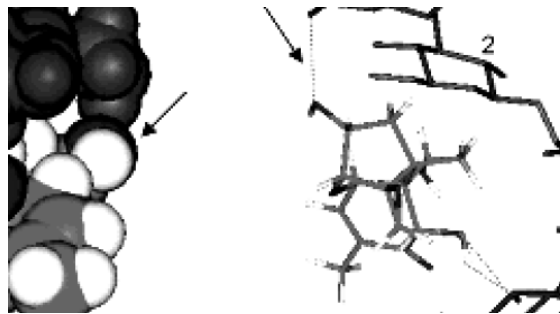
A camada interna da parede celular está firmemente ligada à membrana plasmática por meio de cadeias lineares de quitina compostas de cerca de 90 unidades de N-acetilglucosamina. A camada externa é composta por manoproteínas, cuja função é a troca de moléculas com o meio externo (JOUANY et al., 2007). As β -D-glucanas e a quitina são responsáveis pela rigidez da parede celular, enquanto que as manoproteínas são responsáveis pelo reconhecimento celular e interações com o meio.

Figura 7 – Esquema da organização química da parede celular de *Sccharomyces cerevisiae* (A) e microscopia eletrônica de varredura da parede celular de levedura (B) (JOUANY et al., 2007).



As paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* podem ser adicionadas em alimentos contaminados para remover seletivamente zearalenona, aflatoxina B1, desoxinivalenol e ocratoxina, evitando efeitos negativos sobre o metabolismo animal (YIANNIKOURIS et al., 2006).

Figura 8 – Conformação favorável para interação entre β - glucana e DON, setas indicam os hidrogênios envolvidos na interação (YIANNIKOURIS et al., 2006).



Testes de cinética de interações entre a molécula de β -D-glucana e micotoxina *in vitro* demonstraram a formação de ligações de hidrogênio entre dois grupos hidroxilas da molécula de desoxinivalenol, localizados nos carbonos 3 e 7, ligados aos grupos hidroxilas da molécula de β -glucana, conforme mostrado na Figura 8 (YIANNIKOURIS et al., 2006). Essas ligações são estáveis quando submetidas às variações de pH encontradas ao longo do trato digestivo (YIANNIKOURIS et al., 2004).

Cavret et al. (2009) relataram que a mistura de dois ou mais sorventes pode ser mais eficaz na sorção de desoxinivalenol, tendo em vista que geralmente existe a multicontaminação de micotoxinas nos cereais. Desta forma, a detoxificação teria um potencial de ser eficaz para outras micotoxinas.

4 METODOLOGIA

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA

Os experimentos utilizando fertilizações orgânica e mineral (safras 2009 e 2010) e adubação fosfatada (safra 2010) foram desenvolvidos na fazenda experimental (FAZESC) da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, situada a uma latitude de 23°23' S, longitude de 51°11' W e altitude de 566 metros.

Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Cfa (C - clima temperado; f - clima úmido, com precipitação durante todos os meses do ano e inexistência de estação seca definida; a - verão temperado), com precipitação total anual de 1605 mm, podendo haver um período de seca no inverno com baixa incidência de severas geadas (IAPAR, 1987), com temperatura média anual de 21°C. O solo é tipicamente latossolo vermelho distroférico (EMBRAPA, 1999). As temperaturas máximas, mínimas e médias diárias assim como, a precipitação pluviométrica diária durante o período de condução dos experimentos, fornecidas pela Estação Meteorológica do Instituto Agrônomo do Paraná situada a 5 km da área experimental, estão apresentadas nas Figuras 9 e 10.

Figura 9 – Temperaturas máxima, mínima, média e precipitação pluviométrica diárias do período de condução do experimento em Londrina-PR, safra 2009.

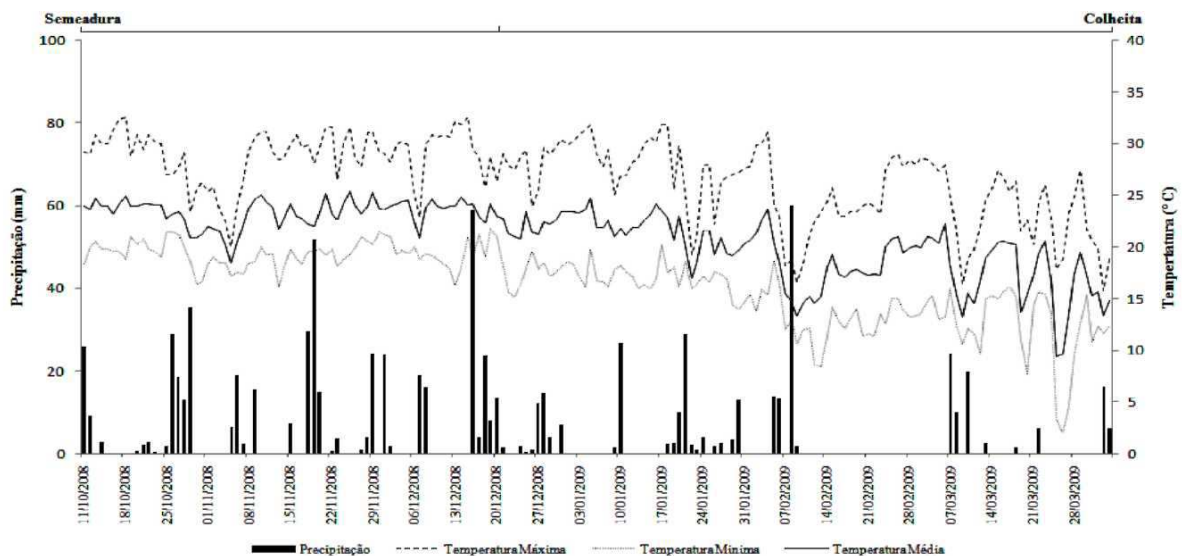
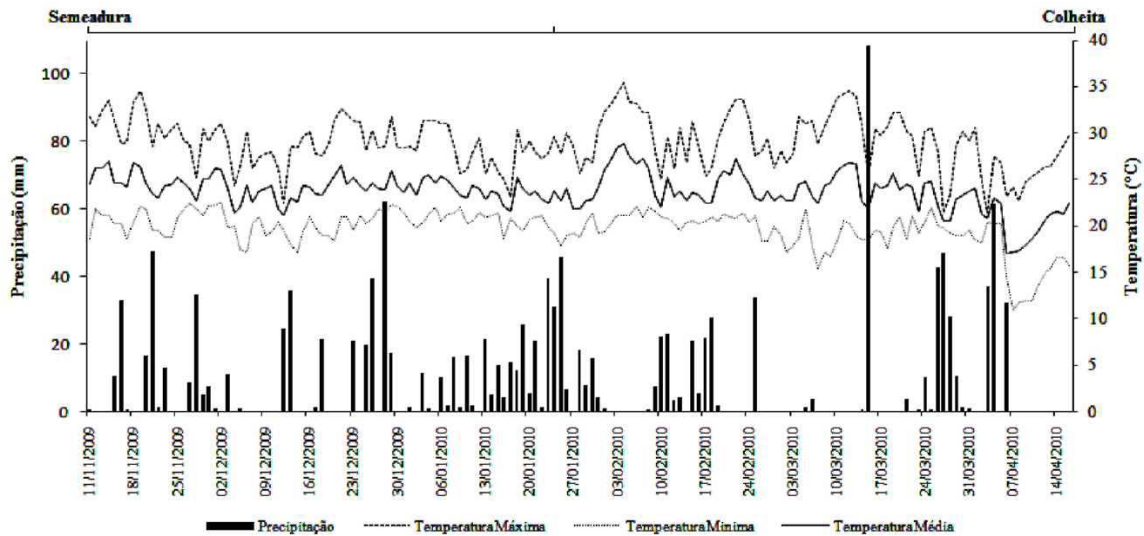


Figura 10 – Temperaturas máxima, mínima, média e precipitação pluviométrica diárias do período de condução do experimento em Londrina-PR, safra 2010.



4.1.1 Formas de Adubação x Cultivares

O experimento foi conduzido sob delineamento experimental de blocos casualizados em esquema fatorial (4x3), com quatro cultivares de milho e três formas de adubação na semeadura, totalizando 12 tratamentos, com 4 repetições. Cada unidade experimental (parcela) foi composta de quatro linhas de cinco metros, com espaçamento de 0,9 metros entre linhas e 0,2 metros entre plantas, conforme Tabela 5.

Foram utilizados três tipos de cultivares, sendo duas variedades de milho crioulo (CAIANO e ASTECA) obtidas de produtores locais da Região Norte do Paraná, um híbrido simples (DKB 390) pertencente à Monsanto e uma variedade de polinização aberta (IPR 114) pertencente ao IAPAR.

Cada cultivar foi submetido às seguintes fertilizações: uma testemunha sem qualquer tipo de adubação; outra com a aplicação de esterco de aves (cama de frango), numa quantidade de aproximadamente 8 toneladas por hectare distribuídas a lanço sobre a área da parcela experimental e outra utilizando fertilizante mineral (NPK) formulado 08-28-16, com 375 kg por hectare distribuídos diretamente no sulco de semeadura.

Tabela 5 – Descrição das cultivares submetidas à adubação orgânica, mineral e controle (sem adubação), nas safras de 2009 e 2010.

Cultivares	Características					Fertilizações		
	Tipo	Textura do Grão	Ciclo (dias)	Resistência ao acamamento	Altura da Planta	Orgânico (n=4)	Mineral (n=4)	Sem adubação (n=4)
Asteca	Crioulo	Duro	Longo	Baixa	2,40	Orgânico (n=4)	Mineral (n=4)	Sem adubação (n=4)
Caiano	Crioulo	Semi-dentado	Longo	Baixa	3,00	Orgânico (n=4)	Mineral (n=4)	Sem adubação (n=4)
IPR 114	VPA	Semiduro	Precoce	Moderada	2,20	Orgânico (n=4)	Mineral (n=4)	Sem adubação (n=4)
DKB 390	Híbrido simples	Semiduro	Precoce	Alta	2,20	Orgânico (n=4)	Mineral (n=4)	Sem adubação (n=4)

VPA= Variedade de polinização aberta

Todas as sementes utilizadas no experimento foram previamente tratadas com inseticida a base de Thiocarb e Imidacloprid na concentração de 0,3 L/ha de acordo com a recomendação do fabricante. Para controle da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) foram realizadas três aplicações de Teflubenzuron (0,1 L/ha) e Methomyl (0,3 L/ha) seguindo recomendação do fabricante dos produtos.

4.1.1.1 Condução experimental

Foram realizadas análises químicas do solo (Tabela 6) e do fertilizante (cama de frango) (Tabela 7). As semeaduras do milho foram realizadas em 10 de outubro de 2008 e 11 de novembro de 2009.

Tabela 6 – Análise química do solo da área experimental localizada na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina, safra 2009 e 2010.

	pH CaCl ₂	P mg/dm ³	K	Ca	Mg	Al	H + Al	SB	CTC pH 7,0	V %
	cmolc/dm ³ de solo									
Safra 2009	5,01	16,52	0,53	3,17	0,86	0,13	6,72	4,55	11,27	40,42
Safra 2010	4,90	11,00	0,59	5,07	1,89	0,04	6,68	7,55	14,23	53,05

SB = Soma de bases trocáveis (Ca²⁺⁺Mg²⁺⁺ K⁺ + Na⁺, em mmolc/dm³).

CTC (mmolc/dm³) = Capacidade de troca cátions do solo a pH 7,0 (Ca²⁺ + Mg²⁺ + K⁺ + H⁺ + Al³⁺).

V % = Porcentagem da saturação de bases do solo.

Tabela 7 – Análise química do fertilizante orgânico (cama de frango), safra 2009 e 2010.

	N	P	K g /Kg	Ca	Mg
Safra 2009	10,1	36	32,4	0,4	0,3
Safra 2010	37,12	15,37	32,5	26,52	5,43

As colheitas foram realizadas nos dias 03 de abril de 2009 quando as espigas de milho apresentavam valores próximos de 14 % de umidade e 16 de abril de 2010, quando as espigas de milho apresentavam valores próximos de 20 % de umidade. Foram colhidas somente as espigas das plantas das linhas centrais de cada parcela. A colheita foi realizada manualmente, sendo obtidas da produção total da área útil da parcela 10 espigas colhidas ao acaso para análise de contaminação fúngica e fumonisinas. A debulha do milho foi realizada manualmente e as amostras foram armazenadas em câmara fria para posteriores análises.

4.1.2 Fontes de Fósforo x Inoculação

O experimento foi conduzido sob delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial 6x2, com 12 tratamentos e quatro repetições, totalizando 48 parcelas. Foram avaliados seis tratamentos referentes a diferentes fontes de fosfato, sendo Testemunha (TST), Superfosfato triplo (SFT), Fosfato de Gafsa (GAFSA), Fosfato Itafós (ITAFÓS), Superfosfato triplo + Fosfato de Gafsa (SFT+Gafsa), Superfosfato triplo + Fosfato Itafós (SFT+ITAFÓS), com dois níveis de inoculação de *Pseudomonas fluorescens* via semente (com e sem) (Tabela 8). A fonte de Fosfato solúvel (SFT) foi aplicada no sulco da semeadura, enquanto as fontes naturais (GAFSA e ITAFÓS) foram aplicadas a lanço.

A cultivar utilizada no experimento foi a Mon 810 (expressa a proteína Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* para o controle de pragas que atacam as espigas do milho), cujas sementes foram tratadas com o fungicida Maxim[®] XL. A dose utilizada na inoculação de *P. fluorescens* nas sementes foi de 140 mL ha⁻¹, sendo 100 mL ha⁻¹ de Rizofós[®], contendo a Estirpe 1008 (coleção de culturas da Rizobacter Argetina S.A.) na concentração de 10⁷ células g⁻¹ (inoculante) e 40 mL ha⁻¹ de Premax R (protetor).

As parcelas foram constituídas por seis linhas de cinco metros de comprimento com espaçamento de 0,9 m entre elas. Foram desconsideradas as duas linhas laterais e 0,5 m das extremidades das mesmas, tornando a área útil total de cada parcela com 10,8 m².

Tabela 8 – Descrição do tratamento utilizando a cultivar Mon 810, submetida a diferentes fontes de fosfato (SFT, GAFSA e ITAFÓS) com e sem a aplicação de *Pseudomonas fluorescens*.

TRATAMENTOS	FONTE DE P	CARACTERISTICA	<i>P. fluorescens</i>
1	TST	-	SEM
2	TST	-	COM
3	SFT	Solúvel	SEM
4	SFT	Solúvel	COM
5	GAFSA	Natural reativo	SEM
6	GAFSA	Natural reativo	COM
7	ITAFÓS	Natural não reativo	SEM
8	ITAFÓS	Natural não reativo	COM
9	SFT+GAFSA	Misto	SEM
10	SFT+GAFSA	Misto	COM
11	SFT+ITAFÓS	Misto	SEM
12	SFT+ITAFÓS	Misto	COM

TST= Testemunha; SFT= Superfosfato triplo; GAFSA= Fosfato de Gafsa; ITAFÓS = Fosfato Itafós; SFT+Gafsa = Superfosfato triplo e Fosfato de Gafsa; SFT+Itafós= Superfosfato triplo e Fosfato Itafós;

4.1.2.1 Condução experimental

Na tabela 9 estão apresentados os resultados da análise química do solo realizada previamente à semeadura. A semeadura do milho foi realizada no dia 18 de dezembro de 2009 e a colheita no dia 27 de abril de 2010. Não foi realizado calagem do solo antes da instalação do experimento.

Tabela 9 – Análise química do solo da área experimental da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina (safra 2010).

Amostra de solo Profundidade	pH CaCl ₂	Zn ¹	P ¹ (Mehlich-1)	K ²	M.O ³	Al ²	H ²	Mg ²	Ca ²	H+Al ²	SB ¹	CTC ² pH 7,0	V %
0,00-0,20m	4,9	1,35	6,61	0,32	13,4	0,12	4,49	0,69	3,51	4,61	0,72	9,12	49,5

1= mg dm³; 2= cmol_c dm³; 3= mg dm³

SB = Soma de bases trocáveis (Ca²⁺+Mg²⁺+ K⁺ + Na⁺, em mmol_c/dm³).

CTC (mmol_c/dm³) = Capacidade de troca cátions do solo a pH 7,0 (Ca²⁺ + Mg²⁺ + K⁺ + H⁺ + Al³⁺). V % = Porcentagem da saturação de bases do solo.

M.O = Matéria Orgânica

Na adubação de semeadura foram aplicados 60 Kg/ha de K₂O. Para os tratamentos de P, foram utilizados 120 Kg/ha de P₂O₅, enquanto que nos tratamentos em que houve mistura (SFT+Gafsa e SFT+Itafós), foram utilizados 60 Kg/ha de P₂O₅ para cada fonte do nutriente. A fonte de P solúvel (SFT), foi aplicada diretamente no sulco de semeadura, e as fontes naturais (Gafsa e Itafós), foram aplicadas a lanço na superfície, sem incorporação.

Quando houve a aplicação conjunta, a forma de aplicação foi realizada individualmente para cada fonte de P, conforme descrito anteriormente.

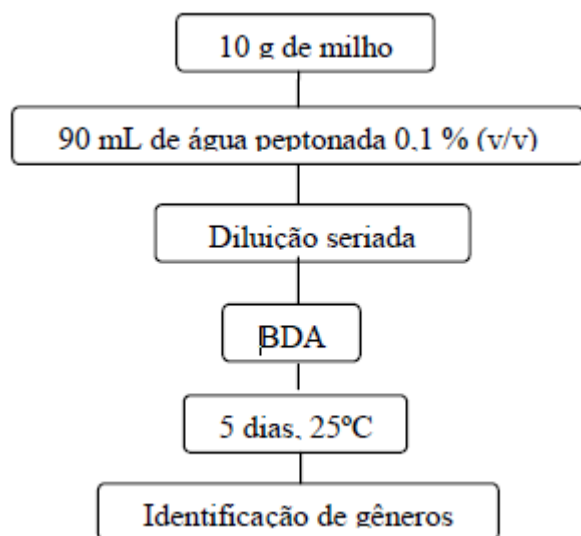
Aos 10 dias após a emergência (DAE) foi realizado o raleio do excesso de plantas, formando uma população de 55 mil plantas por hectare. A adubação nitrogenada de cobertura foi realizada em duas etapas, uma no estágio V4 e outra no V6, utilizando uréia com aplicação e incorporação total de 100 Kg/ha de N (50 Kg/ha cada) para todos os tratamentos. O controle de plantas daninhas durante o ciclo da cultura foi realizado por meio de cultivador e capina manual. A cultivar utilizada apresenta tecnologia transgênica contra ataque de *Spodopterafrugiperda*, possibilitando eficiente controle da praga (FRIZZAS, 2003). Portanto, não houve necessidade de realizar aplicações de inseticidas e fungicidas durante o seu estágio vegetativo.

A colheita foi realizada manualmente, sendo obtidas da produção total da área útil da parcela 10 espigas colhidas ao acaso para análise de contaminação fúngica e fumonisinas. A debulha do milho foi realizada manualmente e as amostras foram armazenadas em câmara fria para posteriores análises.

4.2 ANÁLISE DE MICROBIÓTA FÚNGICA

Uma alíquota de 10g de milho triturado (50 *mesh*) foi homogeneizada em 90 mL de água peptonada estéril 0,1 % (v/v) e submetida a diluições seriadas de 10^{-2} a 10^{-5} . Uma alíquota de 1mL de cada diluição foi transferida para placas de Petri (em duplicata) contendo Ágar Batata Dextrose (BDA) acidificado a pH 4,0 com ácido tartárico (0,1 %). As placas foram incubadas a 25 °C em estufa BOD por 5 dias, procedendo-se à contagem e identificação dos gêneros fúngicos de acordo com os métodos preconizados por Nelson et al. (1983), Singh et al. (1991) e Samsom et al. (1995), conforme demonstrado na figura 11.

Figura 11 – Contagem de bolores e leveduras.



4.3 DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS

Uma alíquota de 10 g de milho triturado foi adicionada de 30 mL de metanol:água (3:1, v/v) e homogeneizada a 180 rpm por 1 hora a 10 °C em incubadora refrigerada (Shaker), marca Marconi[®], seguido de filtração em papel filtro Whatman n° IV.

O filtrado (1 mL) foi submetido à pré-limpeza utilizando mini-coluna de troca aniônica (Sep-Pak Accell Plus QMA - Waters), sendo esta pré-condicionada com 5 mL de metanol, seguido de 5 mL de metanol:água (3:1, v/v). Após aplicação de 1 mL de amostra, a coluna foi lavada com 6 mL metanol:água (3:1), seguidos de 3 mL de metanol, a fim de eliminar possíveis interferentes. As fumonisinas foram eluídas com 10 mL de solução de ácido acético a 0,5 % em metanol. O eluato foi seco sob fluxo de nitrogênio gasoso a 45 °C e o resíduo resultante, dissolvido em 800 µL de metanol:água (3:1, v/v), a seguir fracionado em alíquotas de 200 µL e novamente secos sob fluxo de gás N₂ a 45 °C, procedendo-se ao acondicionamento em freezer (-20 °C) para posterior determinação de fumonisinas por cromatografia líquida de alta eficiência. Uma representação esquemática do processo de extração de fumonisinas é mostrada na Figura 12.

A determinação de fumonisinas foi realizada segundo metodologia descrita por Shephard et al. (1990), modificada por Ueno et al. (1993). A alíquota de 200 µL foi redissolvida em acetonitrila:água (1:1, v/v), e derivatizada com o-ftaldialdeído (OPA), composto por 40 mg de OPA, 1 mL de metanol, 5 mL de tetraborato de sódio 0,1M e 50 µL de 2-mercaptoetanol.

A análise foi realizada por Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), sistema isocrático de fase reversa (bomba Shimadzu LC-10 AD e detector de fluorescência RF-10A XL), utilizando coluna C18 Nucleosil 100-5 (4,6 x 250 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 e 450 nm, respectivamente. A fase móvel consistiu de metanol: fosfato de sódio 0,1 mol/L (80:20, v/v), com pH ajustado para 3,3 (ácido ortofosfórico). O fluxo foi mantido de 1,0 mL/min e a temperatura de 25 °C, conforme mostrado na figura 13.

Figura 12 – Extração de Fumonisinias.

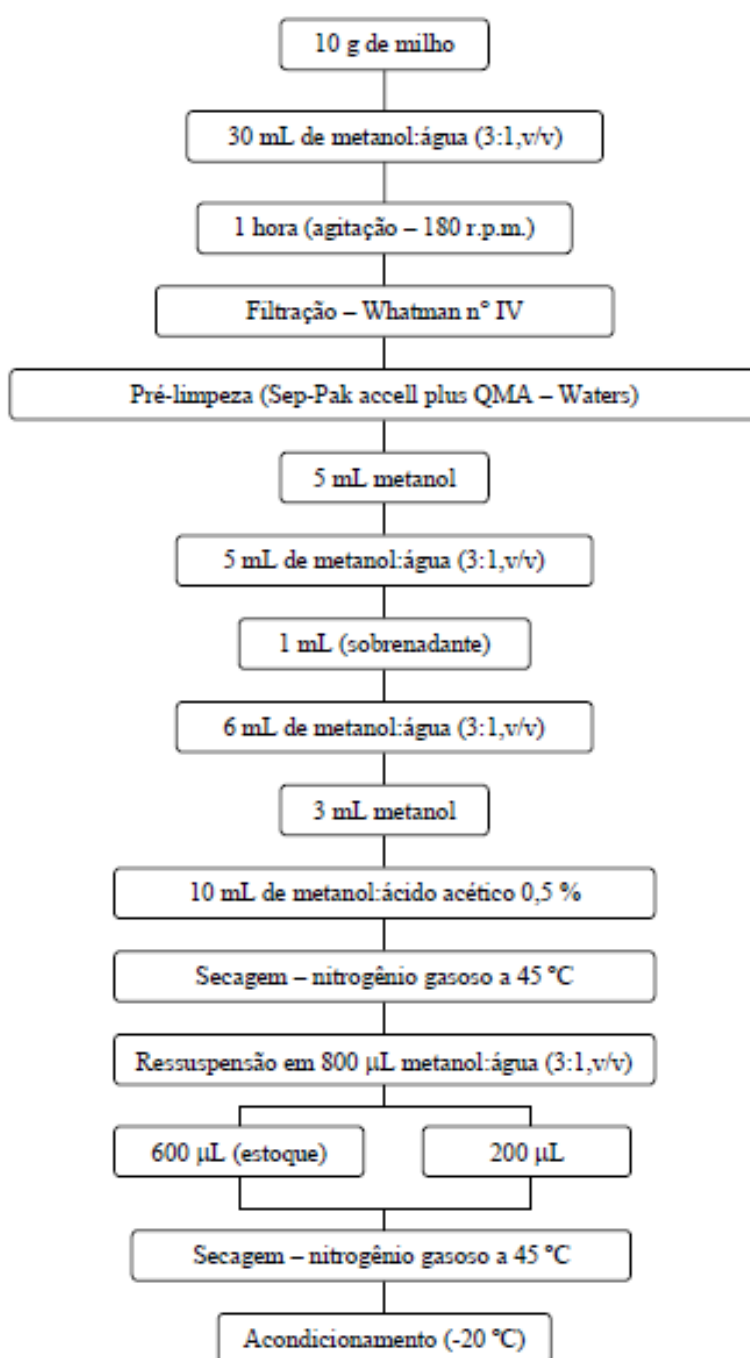
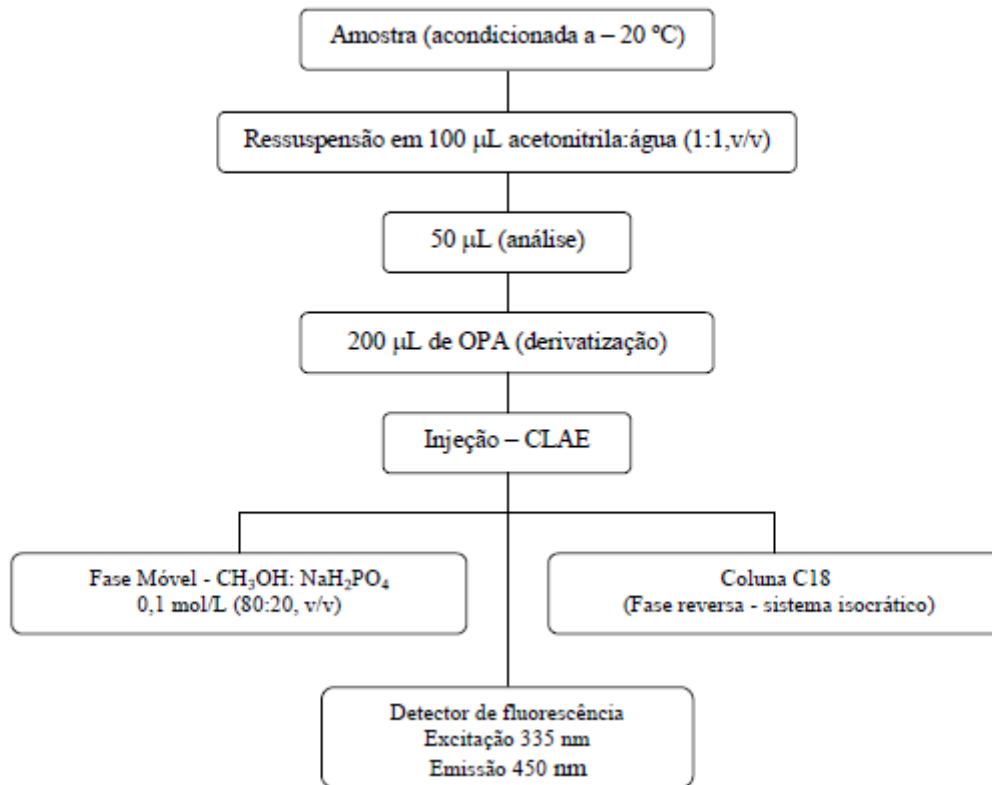


Figura 13 – Determinação de fumonisinas.



4.4 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE ÁGUA (AW)

A atividade de água dos grãos de milho triturados (50 mesh) foi determinada utilizando o equipamento AQUA-LAB, digital, modelo CX-2 (Decagon Devices Inc. Pullman, Washington). Este equipamento emprega a técnica de medida de atividade de água por meio do equilíbrio da pressão de vapor da amostra no espaço vazio da câmara fechada. No equilíbrio, a umidade relativa do ar na câmara é igual à atividade de água na amostra, computada a partir da temperatura medida do ponto de orvalho (BRASILEIRA..., 2005).

4.5 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA

A determinação de nitrogênio foi realizada pelo método de Kjeldahl de acordo com o método oficial da AACC (American Association of Cereal Chemists) (AACC, 1990) (Figura 14). Uma alíquota de 0,2 g da amostra previamente homogeneizada foi adicionada ao tubo digestor contendo 0,2 g de sulfato de cobre pentahidratado, 1,0 g de

sulfato de potássio e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. O tubo foi homogeneizado cuidadosamente e levado para bloco digestor com temperatura de 350 °C, por aproximadamente 5 h. Após o resfriamento, 10 mL de água destilada foram adicionados ao tubo contendo a amostra digerida, posteriormente a amostra foi neutralizada (hidróxido de sódio 50 %) e destilada. O destilado coletado (50 mL em 10 mL de ácido bórico contendo indicador misto) foi titulado com ácido sulfúrico 0,02 N e o teor total de nitrogênio convertido em proteína pelo uso do fator 6,25. Para os cálculos do teor de proteína (%) foi utilizada a fórmula:

$$\text{Proteína (\%)} = \frac{\{(\text{Vgasto na titulação} - \text{Vdo branco}) \times \text{N} \times 14,007 \times \text{Fc} \times 100 \times 6,25\}}{\text{amostra (mg)}}$$

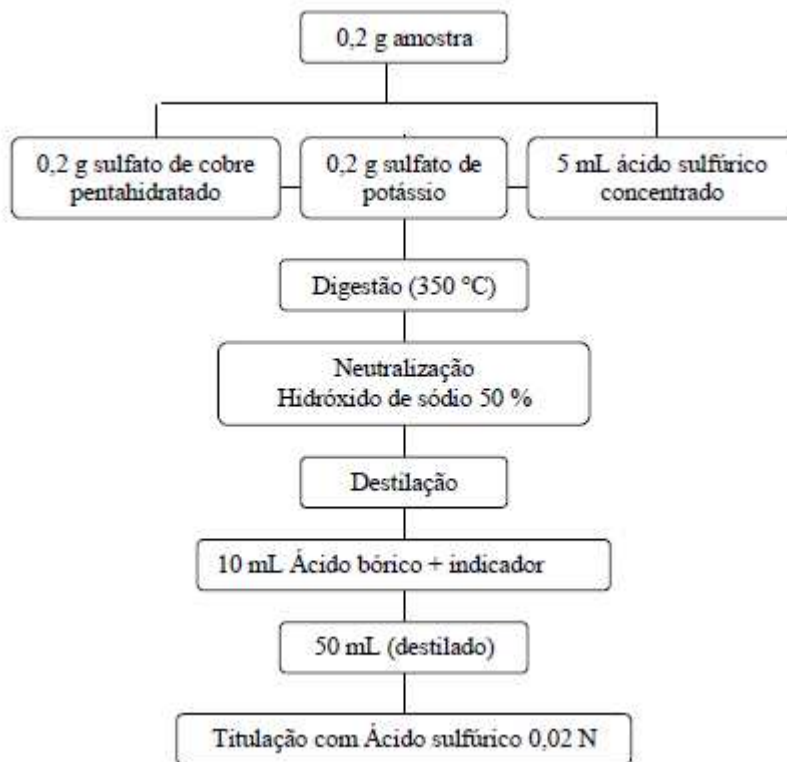
Onde:

P: proteína V: volume

N: normalidade do ácido sulfúrico

Fc: fator de correção

Figura 14 – Determinação de nitrogênio.



4.6 TESTE DE SORÇÃO DE DESOXINIVALENOL

4.6.1 Calibração do Padrão de Desoxinivalenol

Para determinar a concentração do padrão de desoxinivalenol, foi realizada a calibração de acordo com a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (1998), usando-se um espectrofotômetro UV/VIS. O padrão de desoxinivalenol foi dissolvido em 1 mL de Acetato de Etila grau HPLC e a absorvância da solução foi determinada no comprimento de onda de 260 nm sendo a concentração calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\mu\text{g micotoxina/ mL} = \frac{(A \times CF \times MM \times 1000)}{E}$$

em que:

A = absorvância

CF = fator de correção do espectrofotômetro

MM = massa molar da micotoxina (desoxinivalenol = 296 g/mol)

E = absortividade molar da micotoxina (desoxinivalenol em Acetato de Etila = 1410)

4.6.2 Preparo da Curva Padrão

Após determinada a concentração de desoxinivalenol, foi preparada uma curva de calibração com concentrações de 250, 500, 750, 1000 e 1500 ng/ mL de desoxinivalenol e analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

4.6.3 Testes de Sorção *in vitro*

Os experimentos de sorção foram realizados de acordo com um planejamento experimental 2⁴ incompleto, contendo três pontos centrais, em que foram avaliadas as variáveis pH (3,0, 5,0 e 7,0), concentração de DON (2500, 5000 e 7500 ng/mL), quantidade de sorvente (0,2, 1,1 e 2 %), e proporção dos sorventes carvão ativado e β-glucana (30/70, 15/85 e 0/100) nos tempos de incubação entre DON e o sorvente de 30, 60 e 90 minutos, conforme apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 – Níveis do planejamento estatístico 2^4 contendo três pontos centrais, com variáveis codificadas e decodificadas para avaliação do efeito do pH, da concentração de DON, da percentagem e da proporção dos sorventes carvão ativado e β -glucana sobre a sorção de DON, nos tempos de incubação de 30, 60 e 90 minutos *in vitro*

Ensaio	Variáveis Codificadas				Variáveis Decodificadas			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	pH	DON (ng/mL)	Adsovente (%)	CA/BG (%)
1	-1	-1	-1	-1	3,0	2500	0,2	30/70
2	1	-1	-1	1	7,0	2500	0,2	0/100
3	-1	1	-1	1	3,0	7500	0,2	0/100
4	1	1	-1	-1	7,0	7500	0,2	30/70
5	-1	-1	1	1	3,0	2500	2	0/100
6	1	-1	1	-1	7,0	2500	2	30/70
7	-1	1	1	-1	3,0	7500	2	30/70
8	1	1	1	1	7,0	7500	2	0/100
9	0	0	0	0	5,0	5000	1,1	15/85
10	0	0	0	0	5,0	5000	1,1	15/85
11	0	0	0	0	5,0	5000	1,1	15/85

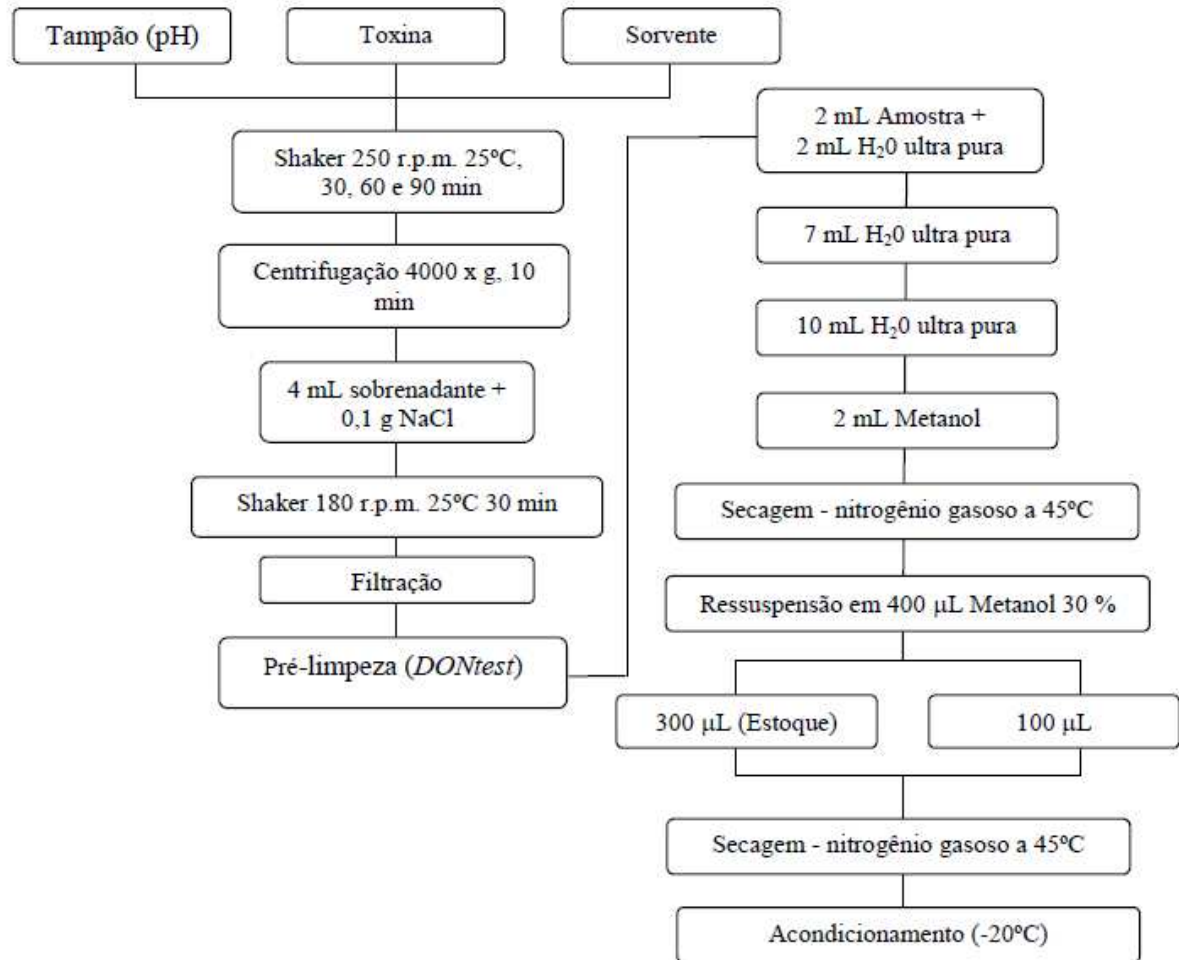
Foram adicionados 10, 55 e 100 mg de sorvente a tubos Falcon, 4,5 mL de tampão fosfato 0,1M, com pH previamente ajustado em 3,0, 5,0 e 7,0 e 0,5 mL de padrão de desoxinivalenol em metanol, nas concentrações de 2500, 5000 e 7500 ng/mL. Os tubos foram agitados em incubadora de bancada (shaker) a 250 r.p.m., 25°C, por 30, 60 e 90 minutos e centrifugados a 4000 x g por 10 minutos. Controles (sem sorvente) foram preparados simultaneamente.

4.6.4 Extração de Desoxinivalenol

A uma alíquota de 4 mL do sobrenadante dos testes de sorção foram adicionados 0,1g de cloreto de sódio, seguido por homogeneização em shaker por 30 minutos a 180 r.p.m. e filtração em filtro de lã de vidro. Uma alíquota de 2 mL deste filtrado foi retirado, adicionado a 2 mL de água ultra-pura, homogeneizado e aplicado na coluna *DONtest* (VICAM, EUA). A coluna foi lavada com 7 mL seguido de 10 mL de água-ultra pura para remoção dos interferentes presentes na amostra. Para a eluição de DON foram adicionados 2 mL de metanol grau HPLC, o eluato foi seco sob fluxo de gás N₂ a 45°C, o resíduo dissolvido em 400 uL de metanol 30 %, a seguir fracionado em alíquotas de 100 uL e novamente secos

sob fluxo de gás N₂ a 45 °C, procedendo-se ao acondicionamento em freezer (-20 °C) para posterior análise de desoxinivalenol, de acordo com a representação esquemática da figura 15.

Figura 15 – Teste de sorção e extração de desoxinivalenol.



4.6.5 Determinação de Desoxinivalenol Adsorvido

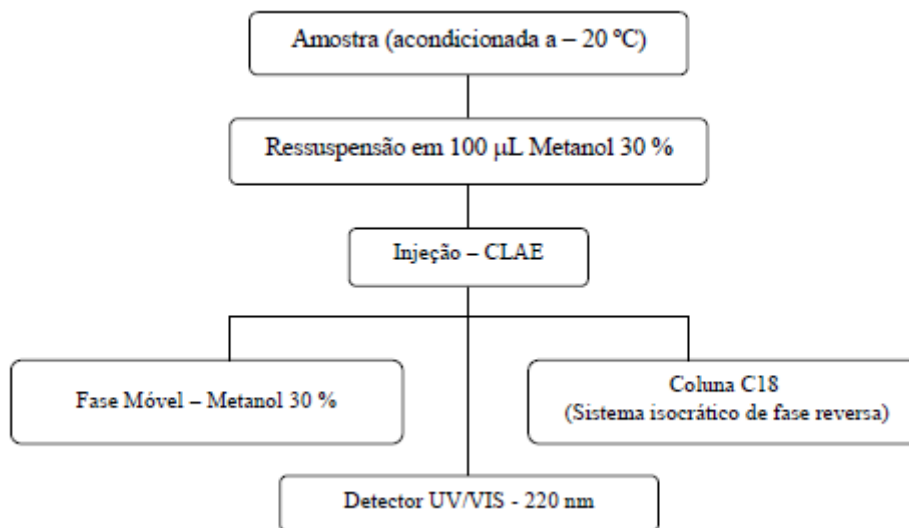
A alíquota de 100 µL acondicionada foi redissolvida em 100 µL metanol 30 % e analisada por Cromatografia líquida de Alta Eficiência - CLAE (Shimadzu), com sistema isocrático de fase reversa, bomba de LC-10AD, detector SPD-10A UV/VIS a 220 nm, utilizando a coluna nucleosil 100 C 18, 5 µm (250 x 4 mm; Merck). A fase móvel consistiu de metanol 30 %, em um fluxo de 0,7 mL/min (Figura 16).

4.6.6 Interpretação dos Resultados

A sorção de desoxinivalenol pelos sorventes testados foi determinada por meio da diferença entre a quantidade da toxina detectada no controle (sem sorvente) e a toxina presente nas amostras (com sorvente), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ sorção} = \frac{(\text{quantidade de toxina no controle} - \text{quantidade de toxina nas amostras})}{100}$$

Figura 16 – Determinação de desoxinivalenol.



4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A Análise de Componentes Principais (ACP) é um método útil de ordenação para a descrição do conjunto de dados, e tem sido utilizada na comparação da contaminação de milho por micotoxinas produzidas por *Fusarium* spp. quando se tem uma grande quantidade de dados (KOS et al., 2002). Esse método reduz a variabilidade de um grupo complexo de dados, apresentando-o de forma facilmente interpretável, sendo, portanto, ideal para a verificação da capacidade de discriminação das variáveis no processo de formação de agrupamentos de cultivares de milho em relação à adubação.

Para o teste de sorção de DON *in vitro*, utilizando o planejamento estatístico 2⁴ incompleto, foi aplicada a análise de variância ANOVA ao nível de 95 % de confiança e metodologia de superfície de resposta (MSR) por meio do software Statistica 7.0 (Stat Soft, Inc.).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão foram redigidos sob forma de artigos a serem submetidos para publicação, os quais são listados abaixo:

- I. CONTAMINAÇÃO POR FUNGOS E FUMONISINAS EM GRÃOS DE MILHO (*Zea mays* L.) DE DIFERENTES CULTIVARES SOB ADUBAÇÃO ORGÂNICA E MINERAL - Periódico Crop Protection
- II. FONTES DE FÓSFORO ASSOCIADAS À INOCULAÇÃO COM *Pseudomonas fluorescens* NA CONTAGEM FÚNGICA E CONTAMINAÇÃO POR FUMONISINAS EM MILHO - Periódico Brazilian Journal of Microbiology
- III. REMOÇÃO DE DESOXINIVALENOL *in vitro* PELA MISTURA DE SORVENTES ORGÂNICO E INORGÂNICO - Periódico Food Additives and Contaminants.

CONTAMINAÇÃO POR FUNGOS E FUMONISINAS EM GRÃOS DE MILHO (*ZEA MAYS* L.) DE DIFERENTES CULTIVARES SOB ADUBAÇÃO ORGÂNICA E MINERAL

RESUMO: Considerando que a principal estratégia para minimizar a contaminação de cereais por micotoxinas é a boa prática agrícola, o presente trabalho visou avaliar o efeito da adubação orgânica (cama de frango) e mineral (NPK) na contaminação de diferentes cultivares de milho (Asteca, Caiano, IPR 114 e DKB 390) por fungos e fumonisinas. O experimento foi conduzido sob delineamento experimental de blocos casualizados em esquema fatorial (4x3) nas safras de 2009 e 2010, totalizando 96 parcelas. Os resultados foram avaliados por Análise Estatística de Componentes Principais (ACP). A contaminação por *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. foi detectada em 83 % e 100 % das amostras na safra 2009 e em 100 % e 69 % das amostras na safra 2010, respectivamente. *Aspergillus* spp. foi detectado somente na safra 2009 (14,5 %). As maiores médias de contaminação por fumonisinas (FB₁ + FB₂) foram detectadas nas cultivares Asteca (4,59 µg/g), Caiano (3,04 µg/g) e IPR 114 (4,04 µg/g), enquanto que nos tratamentos com adubações, as amostras submetidas à adubação orgânica apresentaram maior média de contaminação por fumonisinas (3,74 µg/g) quando comparada com os tratamentos sem adubação (3,15 µg/g) e adubação mineral (2,18 µg/g). A cultivar DKB 390, aliada ao tratamento com adubação mineral, apresentou menores níveis de fumonisinas (FB₁ + FB₂).

Palavras-chave: Micotoxinas. Práticas agrícolas. Controle de contaminação.

INTRODUÇÃO

Fusarium verticillioides é um patógeno primário do milho amplamente distribuído na natureza, responsável por causar infecções que comprometem a integridade fisiológica de muitas plantas de interesse econômico (JOUANY et al., 2005; BINDER et al., 2007; BELTRAN et al., 2009), além de ser o principal produtor de fumonisinas (MARASAS et al, 2001; CAWOOD et al, 1991).

O consumo de alimentos contaminados por fumonisinas, tem sido associado a micotoxicoses, como leucoencefalomalacia em eqüinos (KELLERMAN et al, 1990), edema pulmonar em suínos (OSWEILER et al., 1992), hepatocarcinoma (GELDERBLOM et al., 2004) e defeitos no tubo neural em ratos (SADLER et al., 2002) e seres humanos (GELINEAU-VAN et al., 2009). Na África do Sul, o consumo humano de milho contaminado foi relacionado ao surgimento de câncer esofágico (WHO, 2000; SYDENHAM et al, 1990) e na China, ao câncer hepático (UENO et al. 1997).

Vários pesquisadores têm relatado alta frequência de contaminação por fumonisinas em milho e derivados nos Estados brasileiros (ONO et al., 2008; CALDAS; SILVA, 2007; MORENO et al. 2009). As perdas econômicas nacionais foram avaliadas entre

10 a 25 % da produção total, decorrentes de contaminação de grãos por fungos toxigênicos e presença de micotoxinas (PEDROSA; DEZEN, 1991).

A principal estratégia para minimizar a contaminação de cereais por fungos toxigênicos e micotoxinas é a boa prática agrícola (AWAD et al., 2010). A escolha da cultivar e a aplicação de fertilizantes, principalmente nitrogenados (N), pode contribuir para a redução da contaminação da cultura (ARINO et al., 2009; REID et al., 2001; BLANDINO et al., 2008; HASSEGAWA et al., 2008).

A aplicação de fertilizantes orgânicos pode trazer vários benefícios ao solo, como a liberação gradativa de nutrientes por meio da decomposição natural e contribuição para a redução de lixiviação, fixação e volatilização dos nutrientes, além do fornecimento de produtos da decomposição orgânica, que favorecem o desenvolvimento da planta (ZECH et al., 1997; FORNAZIERI FILHO, 2007).

Entre os fertilizantes orgânicos, os esterco constituem um dos melhores métodos de adubação de culturas e manutenção da matéria orgânica do solo, podendo substituir, parcial ou totalmente, o fertilizante químico na produção de grãos (MENEZES et al., 2007). Diversos autores relatam que a aplicação de esterco na cultura pode suprimir o desenvolvimento de patógenos no solo, como *Fusarium verticillioides*, e reduzir a contaminação da planta por meio do aumento da população microbiana e competição entre os microrganismos (OSUNLAJA, 1990; CONN; LAZAROVITS, 1999; ALAKONYA et al., 2003).

A utilização da cama de frango como fertilizante na cultura do milho constitui uma alternativa promissora, sendo uma fonte de nitrogênio de baixo custo e disponível em grandes quantidades quando comparado a outros tipos de esterco (SANTOS et al., 2004; EL FARESI, 1995).

Considerando o número limitado de trabalhos relacionados às práticas agrícolas para minimização da contaminação de micotoxinas em grãos, o trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adubação orgânica (cama de frango) e mineral (NPK) na contaminação por fumonisinas em diferentes cultivares de milho recém-colhido da Região Norte do Paraná.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização da Área

Os experimentos foram realizados na fazenda experimental (FAZESC) da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, situada a uma latitude de 23°23' S, longitude de 51°11' W e altitude de 566 metros. Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Cfa (C - clima temperado; f - clima úmido, com precipitação durante todos os meses do ano e inexistência de estação seca definida; a - verão temperado), com precipitação total anual de 1605 mm, podendo haver um período de seca no inverno com baixa incidência de geadas intensas (IAPAR, 1987), com temperatura média anual de 21°C. O solo é tipicamente latossolo vermelho distroférrico (EMBRAPA, 1999). As temperaturas máximas, mínimas e médias 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 nas Figuras 1 e 2.

Figura 1 – Temperaturas máxima, mínima, média e precipitação pluviométrica diárias do período de condução do experimento em Londrina-PR, safra 2009.

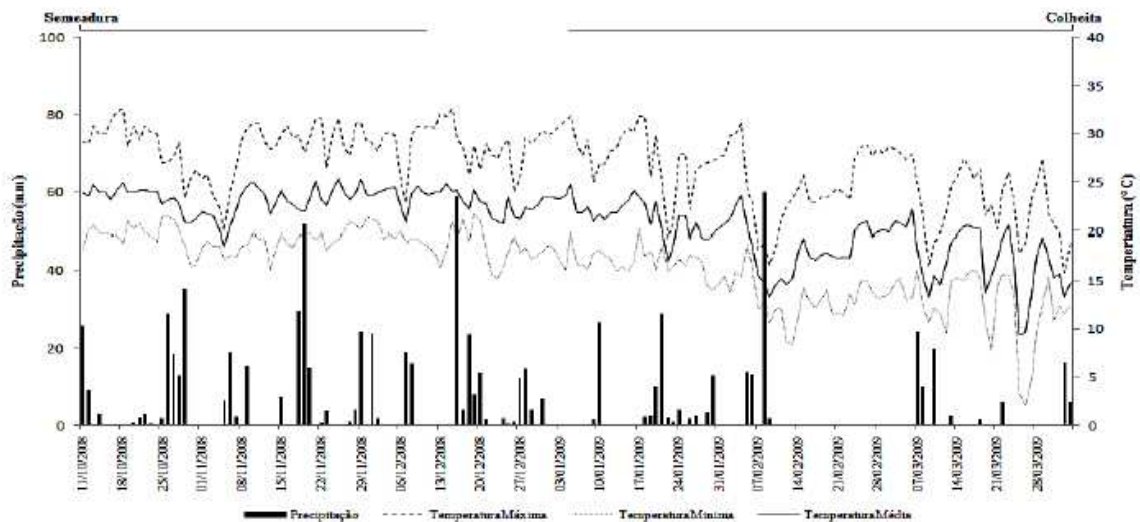
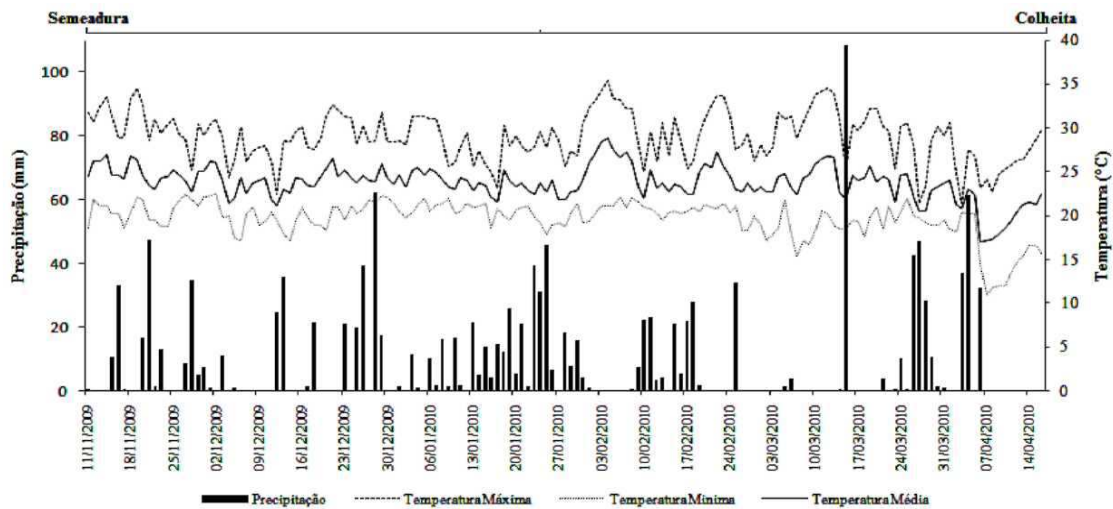


Figura 2 – Temperaturas máxima, mínima, média e precipitação pluviométrica diárias do período de condução do experimento em Londrina-PR, safra 2010.



Condução Experimental

O experimento foi conduzido sob delineamento experimental de blocos casualizados em esquema fatorial (4x3), com quatro cultivares de milho, sendo duas variedades de milho crioulo (CAIANO e ASTECA) obtidas de produtores locais da Região Norte do Paraná, um híbrido simples (DKB 390) pertencente à Monsanto e uma variedade de polinização aberta (IPR 114) pertencente ao IAPAR, conforme mostra a Tabela 2. Cada cultivar foi submetida às seguintes adubações: testemunha sem qualquer tipo de adubação; aplicação de esterco de aves (cama de frango), numa quantidade de aproximadamente 8 toneladas por hectare distribuídas a lanço sobre a área da parcela experimental e; fertilizante mineral (NPK) formulado 08-28-16, com 375 kg por hectare distribuídos diretamente no sulco de semeadura, totalizando 12 tratamentos, com 4 repetições. Cada unidade experimental (parcela) foi composta de quatro linhas de cinco metros, com espaçamento de 0,9 metros entre linhas e 0,2 metros entre plantas.

Tabela 1 – Análise química do fertilizante orgânico (cama de frango), safras 2009 e 2010.

	N	P	K	Ca	Mg
	g /Kg				
Safra 2009	10,1	36	32,4	0,4	0,3
Safra 2010	37,12	15,37	32,5	26,52	5,43

As sementes utilizadas no experimento foram previamente tratadas com inseticida a base de Thiocarb e Imidacloprid na concentração de 0,3 L/ha de acordo com a

recomendação do fabricante. Para o controle da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) foram realizadas três aplicações de Teflubenzuron (0,1 L/ha) e Methomyl (0,3 L/ha) seguindo a recomendação do fabricante dos produtos.

Tabela 2 – Características das cultivares submetidas à adubação orgânica, mineral e controle (sem adubação), nas safras de 2009 e 2010

Cultivares	Características					Fertilizações		
	Tipo	Textura do Grão	Ciclo (dias)	Resistência ao acamamento	Altura da Planta	Orgânico (n=4)	Mineral (n=4)	Sem adubação (n=4)
Asteca	Crioulo	Duro	Longo	Baixa	2,40	Orgânico (n=4)	Mineral (n=4)	Sem adubação (n=4)
Caiano	Crioulo	Semi-dentado	Longo	Baixa	3,00	Orgânico (n=4)	Mineral (n=4)	Sem adubação (n=4)
IPR 114	VPA	Semiduro	Precoce	Moderada	2,20	Orgânico (n=4)	Mineral (n=4)	Sem adubação (n=4)
DKB 390	Híbrido simples	Semiduro	Precoce	Alta	2,20	Orgânico (n=4)	Mineral (n=4)	Sem adubação (n=4)

VPA= Variedade de polinização aberta

As colheitas foram realizadas nos dias 03 de abril de 2009 (14 % de umidade) e 16 de abril de 2010 (20 % de umidade) manualmente. Foram obtidas da produção total da área útil da parcela, 10 espigas colhidas ao acaso para análise de contaminação fúngica e fumonisinas. A debulha do milho foi realizada manualmente e as amostras foram armazenadas em câmara fria para posteriores análises.

Avaliação da microbiota fúngica

Duzentos gramas de milho de cada repetição de campo foram triturados até granulometria de 50 "mesh" e homogeneizados. Uma alíquota de 10 g de milho triturado foi homogeneizada em 90 mL de água peptonada estéril 0,1 % (v/v) e submetida a diluições seriadas em tubos contendo 9,0 mL do mesmo diluente até fator 10^{-5} . Uma alíquota de 1 mL de cada diluição foi transferida para placas de Petri (em duplicata) contendo ágar batata dextrosado (BDA - pH 4,0) adicionados de 50 µg/mL de cloranfenicol e incubados a 25 °C por 6 dias, procedendo-se à contagem e identificação dos gêneros de acordo com os métodos preconizados por Nelson et al. (1983), Singh et al. (1991) e Samson et al. (1995).

Determinação de fumonisinas

Para extração de fumonisinas, uma alíquota de 10 g de milho triturado de cada repetição de campo foi adicionada a 30 mL de metanol:água (3:1, v/v), mantida em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente, seguida de agitação a 150 r.p.m. por 30 minutos. A suspensão foi centrifugada a 4500 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi submetido à pré-limpeza em minicoluna de troca aniônica Sep-Pak accell plus QMA (Waters Co., Ltda), previamente acondicionada com 6 mL de metanol:água (3:1, v/v) seguida de 3 mL de metanol, sendo as fumonisinas eluídas com 10 mL de ácido acético 0,5 % em metanol. O eluato foi seco a 45 °C, o resíduo dissolvido em 800 µL de metanol:água (3:1, v/v), a seguir fracionado em alíquotas de 200 µL e novamente secos sob fluxo de gás N₂ a 45 °C, procedendo-se ao acondicionamento em freezer (-20 °C) para posterior análise de fumonisinas.

A determinação de fumonisinas (FB1 e FB2) foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo o método de Shephard et al. (1990) modificado por Ueno et al. (1993). A alíquota de 200 µL seca sob nitrogênio foi redissolvida em acetonitrila:água (1:1, v/v) e submetida à derivatização com 200 µL de o-ftaldialdeído (OPA) (40 mg de OPA, 1 mL de metanol, 5 mL de tetraborato de sódio a 0,1M e 50 µL de 2-mercaptoetanol), injetado dentro de 1 minuto em cromatógrafo líquido de alta eficiência - CLAE (sistema isocrático de fase reversa) consistindo de uma bomba Shimadzu LC-10 AD, detector de fluorescência RF-10A XL e, coluna C18 Nucleosil 100-5 (4,6 x 250 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co.). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram de 335 nm e 450 nm, respectivamente. A fase móvel consistiu de CH₃OH:NaH₂PO₄ 0,1 mol/L (80:20, v/v) ajustado para pH 3,3 com ácido orto-fosfórico. O fluxo foi de 1 mL.min⁻¹ e temperatura de forno constante a 25 °C. Os limites de detecção foram de 27,5 ng/g para FB₁ e de 35,3 ng/g para FB₂.

Determinação da Atividade de Água

A atividade de água dos grãos de milho triturados (50 mesh) foi determinada utilizando o equipamento Aqualab CX-2 (Decagon Devices Inc., Pullman, Washington).

Determinação de Proteínas

A concentração de nitrogênio total foi determinada pelo método de Kjeldahl (AACC, 1990), utilizando o fator de conversão 6,25 para obtenção da concentração de proteína total em grãos de milho.

Análise Estatística

A Análise de Componentes Principais (ACP) é um método útil de ordenação para a descrição do conjunto de dados, e tem sido utilizada na comparação da contaminação de milho por micotoxinas produzidas por *Fusarium* spp. quando se tem uma grande quantidade de dados (KOS et al., 2002). Esse método reduz a variabilidade de um grupo complexo de dados, apresentando-o de forma facilmente interpretável, sendo, portanto, ideal para a verificação da capacidade de discriminação das variáveis no processo de formação de agrupamentos de cultivares de milho em relação à adubação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3 estão apresentadas as frequências absoluta e relativa dos principais gêneros fúngicos (*Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*) detectados em 96 amostras de diferentes cultivares de milho (Asteca, Caiano, DKB 390 e IPR 114), submetidos à adubação orgânica e mineral das safras 2009 (n=48) e 2010 (n=48) da região norte do Paraná. *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. foram os gêneros prevalentes, sendo detectados em 83,3 % e 100 % das amostras na safra 2009 e em 100 % e 68,7 % das amostras na safra 2010, respectivamente, enquanto que *Aspergillus* spp. foi detectado em 14,6 % das amostras da safra 2009.

Tabela 3 – Freqüência absoluta e relativa dos principais gêneros fúngicos dos diferentes cultivares de milho submetidos à adubação orgânica e mineral, provenientes da região Norte do Paraná nas safras de 2009 (n=48) e 2010 (n=48).

Gêneros fúngicos	Safras			
	2009 (n = 48)		2010 (n = 48)	
	FA	FR	FA	FR
<i>Fusarium</i> spp.	40	83,3	48	100
<i>Penicillium</i> spp.	48	100	33	68,7
<i>Aspergillus</i> spp.	7	14,6	ND	ND

FA = Freqüência absoluta; FR = Freqüência relativa (%); ND= Não detectado

A alta freqüência de *Fusarium* spp. está de acordo com os dados relatados por Rocha et al. (2009) e Ono et al. (2008). Rocha et al. (2009) detectaram a contaminação de 100 % das amostras de milho por *Fusarium* spp., provenientes das cidades de Várzea - Mato Grosso, Santa Maria - Rio Grande do Sul, Nova Odessa - São Paulo e Campinhos - Bahia. Ono et al (2008) detectaram em 870 amostras de milho da Região Norte do Paraná, a contaminação por *Fusarium* spp. em 100 % das amostras, *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. em 84,1 % e 5,6 % das amostras na safra de 2003 e em 95,3 % e 19,8 % da safra de 2004, respectivamente.

Os dados de contagem dos principais gêneros fúngicos detectados nos diferentes cultivares (Asteca, Caiano, DKB 390 e IPR 114), submetidos à adubação orgânica e mineral na Região Norte do Paraná (safra 2009 e 2010), estão apresentados na Tabela 4. Na safra de 2009, a cultivar Asteca apresentou a maior freqüência de contaminação por *Fusarium* spp. (100 % das amostras), seguida pela cultivar IPR 114 (83,3 %), Caiano e DKB 390 (75 %), com média na faixa de 10^3 UFC/g. *Penicillium* spp. foi detectado em 100 % das amostras das quatro cultivares, com média variando de $9,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^4$ UFC/g. *Aspergillus* spp. foi detectado em menor freqüência nas cultivares Asteca (16,6 %), Caiano (8,3 %) e IPR 114 (33,3 %), com média de contaminação de 10^2 a 10^3 UFC/g. A média da contagem total de bolores e leveduras ficou na faixa de 10^4 nas diferentes cultivares analisadas. Na safra de 2010, *Fusarium* spp. foi detectado em 100 % das amostras das cultivares avaliadas, com média na faixa de 10^4 UFC/g. *Penicillium* spp. foi detectado em todas as cultivares, porém a maior freqüência ocorreu na cultivar DKB 390 (91,3 % das amostras). A média de contaminação por *Penicillium* spp. ficou na faixa de 10^3 UFC/g, enquanto que *Aspergillus* spp. não foi detectado em nenhuma cultivar. A média da contagem total de bolores e leveduras ficou na faixa de 10^4 nas diferentes cultivares analisadas. Esses resultados (Tabela

4) foram menores que os relatados por Moreno et al (2009) em 240 amostras de milho da região Norte do Paraná (safras 2003 e 2004), em que *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. foram detectados na faixa de 10^2 a 10^5 UFC/g.

Em relação aos tratamentos com adubação orgânica e mineral (Tabela 5), na safra de 2009 a média de contaminação por *Fusarium* spp. ficou na faixa de 10^3 UFC/g, sendo a maior frequência de contaminação detectada no tratamento sem adubação (93,7 %). *Penicillium* spp. foi detectado em 100 % das amostras avaliadas nas diferentes cultivares, com média de contaminação na faixa de 10^4 UFC/g. *Aspergillus* spp. foi detectado em 6,25 % e 37,5 % das amostras dos tratamentos sem adubação e com adubação orgânica, respectivamente, a contaminação variou de 10^2 a 10^3 UFC/g, enquanto que no tratamento com adubação mineral não foi detectada a contaminação por este gênero. Na safra de 2010, a média de contaminação por *Fusarium* spp. variou de $1,6 \times 10^4$ a $2,4 \times 10^4$ UFC/g, sendo que todas as amostras apresentaram contaminação. *Penicillium* spp. foi detectado na faixa de 10^3 UFC/g, sendo a maior frequência de contaminação (81,2 %) no tratamento com adubação orgânica. *Aspergillus* spp. não foi detectado em nenhum tratamento. A baixa frequência de *Aspergillus* spp. está de acordo com os resultados obtidos por Marin et al. (1995) que sugeriram uma correlação negativa quanto à contaminação do grão de milho por *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp., devido à competição tanto por espaço quanto por nutrientes.

Na Tabela 6 estão apresentados os níveis de contaminação por fumonisinas ($FB_1 + FB_2$), atividade de água e concentração de proteínas das diferentes cultivares de milho da Região Norte do Paraná, safras 2009 e 2010. Na safra de 2009, as cultivares Asteca e Caiano apresentaram maior média de contaminação (0,27 ug/g e 0,21 ug/g, respectivamente) por fumonisinas ($FB_1 + FB_2$), em relação à IPR 114 (0,11 ug/g) e DKB 390 (não detectado). Na safra de 2010, as maiores médias de contaminação por fumonisinas ($FB_1 + FB_2$) foram detectadas nas cultivares Asteca (4,59 ug/g), Caiano (3,04 ug/g) e IPR (4,04 ug/g), enquanto que a menor na cultivar DKB 390 (0,96 ug/g). A cultivar DKB 390 é geneticamente melhorada, com sistema radicular bem desenvolvido que proporciona alto aproveitamento de água e nutrientes, além de possuir bom empalhamento das espigas e resistência ao acamamento. Essas características podem ter favorecido a redução da contaminação por fumonisinas, quando comparado à variedade IPR 114 e as cultivares crioulas (Asteca e Caiano). A média de contaminação por fumonisinas ($FB_1 + FB_2$) (Tabela 7) nos tratamentos sem adubação, com adubação orgânica e mineral foram de 0,38, 0,12 e 0,10 ug/g, (safra de 2009) e 3,15, 3,74 e 2,18 ug/g (safra de 2010), respectivamente. As amostras de milho das diferentes cultivares (Asteca, Caiano, IPR 114, DKB 390) e tratamentos (sem adubação e com

adubação mineral e orgânica) na safra de 2009 (Tabela 6) apresentaram níveis médios de fumonisinas (FB₁ + FB₂) maiores (0,10 - 3,74 µg/g) que Moreno et al. (2009), porém, menores que Abbas et al. (2006). Moreno et al. (2008) detectaram fumonisinas em 100 % das amostras de milho recém colhido (n= 300), nas safras dos anos de 2003 e 2004 da região norte do Paraná, com níveis médios de contaminação por fumonisinas de 1,31 µg/g e 1,36 µg/g, respectivamente. Abbas et al. (2006) detectaram a contaminação de 8 a 83 µg/g por fumonisinas em 65 amostras de milhos híbridos cultivados no período de 1999 a 2001 em Arkansas (EUA).

As médias de atividade de água das diferentes cultivares e adubações da safra de 2009 variaram de 0,40 a 0,49 (Tabela 6 e 7). A variedade DKB 390 (0,43) e o tratamento com adubação mineral (0,44) apresentaram menores valores, enquanto que os maiores valores foram detectados nas amostras IPR 114 (0,47) e no tratamento sem adubação (0,46). Na safra de 2010, as médias de atividade de água variaram de 0,73 a 0,86, sendo que a cultivar IPR 114 e o tratamento com adubação mineral apresentaram maiores médias de valores, 0,78 e 0,80 respectivamente. A maior atividade de água das amostras de milho dessa safra foi detectada na cultivar Caiano (0,84) e nos tratamentos sem adubação (0,82) e com adubação orgânica (0,82). Os menores valores de atividade de água detectados nas amostras da safra de 2009 podem estar relacionados aos menores índices de precipitação pluviométrica (IAPAR, 2010), bem como ao maior período de secagem do grão no campo (14 % de umidade), quando comparado com a safra de 2010 (20 % de umidade).

Diversos autores demonstraram que a atividade de água desempenha um papel importante na produção de fumonisinas (ALBERTS et al., 1990; LE BARS et al., 1994, MARIN et al., 1995; CAHAGNIER et al., 1995). As amostras de milho da safra de 2010 apresentaram maiores valores de atividade de água e maiores médias de *Fusarium* spp., em relação à safra de 2009, conseqüentemente maiores níveis de contaminação por fumonisinas. Esses resultados sugerem que a contaminação ocorreu no período antes da colheita, uma vez que em valores de 0,85 a 0,86 de atividade de água a produção de fumonisina B1 não ocorre (CAHAGNIER et al., 1995).

As diferenças de contaminação por fumonisinas e atividade de água nas safras de 2009 e 2010 pode ter sido reflexo das condições climáticas durante o desenvolvimento da cultura no campo (Figura 3), uma vez que na safra de 2009 ocorreu menor índice de precipitação pluviométrica (85,9 mm) que a safra de 2010 (130 mm) no mês anterior à colheita. Esses resultados corroboram com Ono et al. (1999) que analisaram 150 amostras de milho provenientes da região Norte, Centro-Oeste e Centro-Sul do Estado do

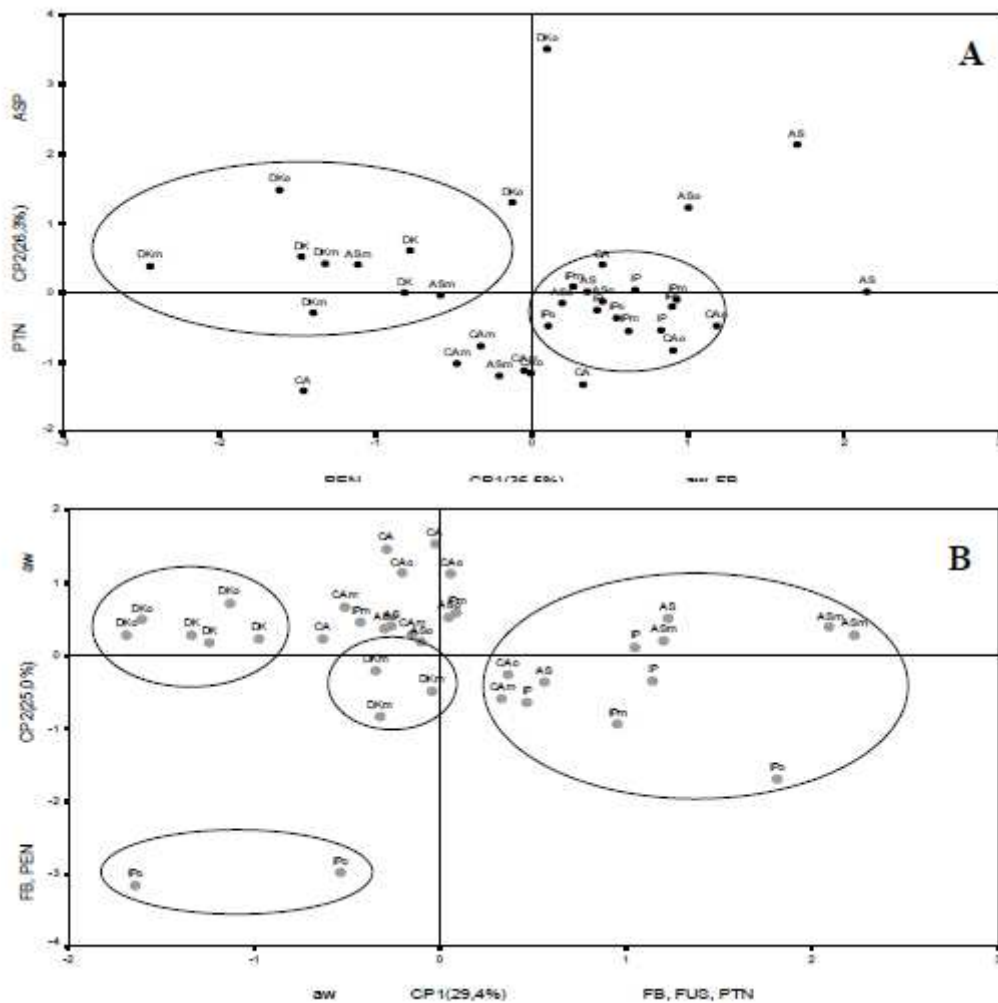
Paraná e as maiores contaminações por fumonisinas foram detectadas em amostras coletadas da região Norte com maior índice de precipitação pluviométrica registrada no mês anterior à colheita (202 mm), quando comparado com a região Centro-Sul com menor índice (92,8 mm). As maiores médias de temperaturas durante o cultivo da safra de 2010, quando comparado à safra de 2009, também podem ter contribuído para o desenvolvimento de *Fusarium* spp. Marin et al. (1995) descreve que temperaturas de 25° C a 30° C favorecem a contaminação de grãos de milho por *F. verticillioides*, bem como a produção de fumonisinas B1 e B2.

A concentração de proteínas nas amostras de milho da safra de 2009 variou de 7,5 a 11,8 % (Tabela 6). A maior média de proteínas foi detectada na amostra de milho Caiano (10,6 %) e a menor no milho DKB 390 (8,2 %). As médias de proteínas das amostras sob tratamentos de adubação (Tabela 7) variaram de 9,2 % (tratamento sem adubação) a 9,5 % (adubação mineral). Na safra de 2010, a concentração de proteínas das diferentes cultivares e tratamentos com adubações variou de 7,4 a 11,1 %. A variedade DKB 390 apresentou menor concentração de proteínas (7,8 %) e contaminação por fumonisinas (0,89 ug/g), quando comparado com os demais cultivares, enquanto que os demais tratamentos de adubações (orgânico e mineral), não apresentaram diferenças quanto à concentração de proteínas e contaminação por fumonisinas.

A avaliação estatística multivariada dos dados em duas dimensões, demonstrando os pontos referentes aos tratamentos com diferentes cultivares de milho submetidos à adubação orgânica e mineral das safras 2009 e 2010, pode ser observada na Figura 3. As duas primeiras componentes principais (CP1 e CP2) dos diferentes tratamentos analisados, explicam 62,8 % e 54 % da variância dos dados, nas safras de 2009 e 2010, respectivamente. Os círculos destacam os grupos de maior similaridade de amostras de acordo com a análise hierárquica de grupos pelo método de Ward (Figura 4). Na safra de 2009 (Figura 3A), fumonisinas (FB₁ + FB₂) e atividade de água tiveram maior influência sobre as cultivares Caiano (CA) e IPR 114 (IP), os tratamentos sem e com adubação orgânica e mineral na CP1 apresentaram maior contaminação por fumonisinas e valores mais altos de atividade de água, enquanto que na CP2 a cultivar DKB 390 (DK) foi mais influenciada pela contaminação por *Aspergillus* spp. nos três tratamentos avaliados, com maior destaque para a amostra DKB 390 com adubação orgânica (DKo) que apresentou maior contaminação por esse fungo. A cultivar DKB 390 (DK) apresentou menor contaminação por fumonisinas, quando comparada às demais cultivares, evidenciando a importância da escolha da cultivar. As diferentes adubações, sem adubação e com adubação orgânica e mineral, não

demonstraram diferenças quanto à contaminação por *Fusarium* spp. e fumonisinas (FB₁ + FB₂)

Figura 3 – Dispersão das amostras nos componentes principais 1 e 2, para as diferentes cultivares de milho, submetidas à adubação orgânica e mineral, provenientes da região norte do Paraná, das safras de 2009 (A) e 2010 (B).



DK= DKB 390 + Controle; DKo= DKB 390 + adubo orgânico; DKm= DKB 390 + adubo mineral; IP= IPR 114 + Controle; IPo= IPR 114+ adubo orgânico; IPm= IPR 114+ adubo mineral; AS= Asteca + Controle; ASo= Asteca + adubo orgânico; ASm= Asteca + adubo mineral; CA= Caiano + Controle; CAo= Caiano + adubo orgânico; CAM= Caiano + adubo mineral.

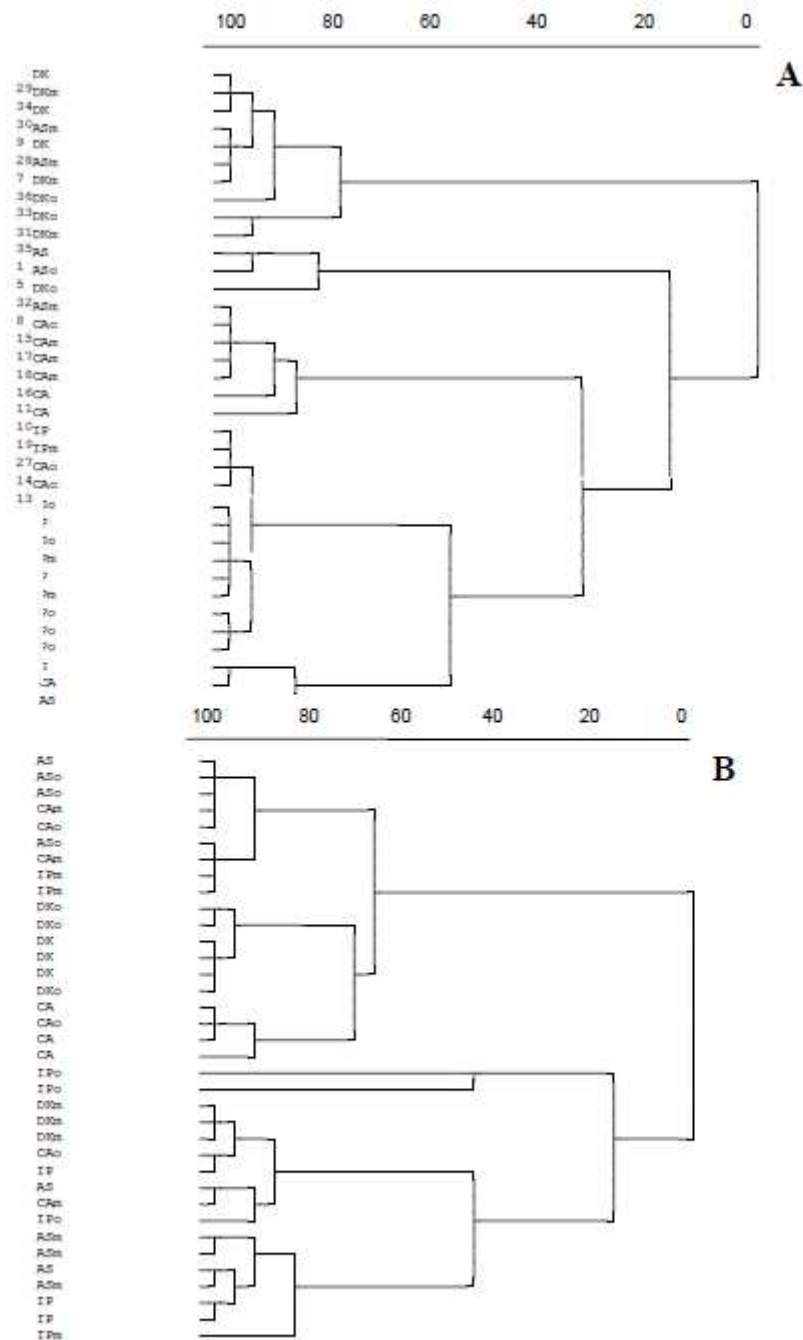
Na safra de 2010 (Figura 3B), as cultivares de milho Caiano, Asteca e IPR 114 tiveram maior influência da concentração de proteína, contaminação por *Fusarium* spp. e por fumosininas (FB₁ + FB₂) na CP1. Na CP2 a cultivar DKB 390 (DK) teve maior influência da atividade de água e quando submetida ao tratamento com adubação mineral, demonstrou menores níveis de contaminação por fumonisinas (FB₁ + FB₂). Por outro lado, a cultivar IPR 114 com adubação orgânica teve maior influência dos níveis de contaminação por

fumonisinias (FB₁ + FB₂) e *Penicillium* spp. com relação às demais cultivares analisadas. Nesta safra, além da cultivar, a escolha do fertilizante também contribuiu para minimização da contaminação de grãos de milho por fumonisinias.

A maior contaminação por *Fusarium* spp. e fumonisinias (FB₁ + FB₂) detectada na safra de 2010 pode estar relacionada ao fato do adubo orgânico (cama de frango) apresentar maiores níveis de nitrogênio (37,12 g/kg), quando comparado à safra de 2009 (10,1 g/kg). O excesso de nitrogênio na safra de 2010 pode ter levado a planta ao estado de estresse e conseqüentemente aumentado a incidência de contaminação por *Fusarium* spp. e fumonisinias (BLANDINO et al., 2008).

A similaridade das amostras e das variáveis, estudadas pela análise de grupos, auxilia na interpretação dos resultados. O dendrograma (Figura 4) mostra a similaridade das amostras (acima de 60 %) para as diferentes cultivares de milho submetidas à adubação orgânica e mineral, nas safras de 2009 e 2010. A cultivar DKB 390 (DK) das safras de 2009 e 2010 separam-se das demais, devido às semelhanças quanto à menor contaminação por *Fusarium* spp. e por fumonisinias (FB₁ + FB₂). A aplicação de adubação mineral na cultivar DKB 390 proporcionou menores níveis de contaminação por fumonisinias (FB₁ + FB₂) em relação aos tratamentos sem adubação e com adubação orgânica na safra de 2010. No entanto, as cultivares crioulo (Asteca e Caiano) e a adubação orgânica apresentaram maiores níveis de contaminação. Esses resultados contrastam com Osunlaja (1990) e Alakonya et al. (2003). Alakonya et al. (2003) relataram que a aplicação de esterco caprino pode reduzir a contaminação da raiz do milho por *Fusarium verticillioides*, sendo efetivo em áreas com contaminações prevalentes desse patógeno. Osunlaja (1990) demonstrou que a aplicação de esterco de aves juntamente com materiais orgânicos (folhas, palha de arroz, capim e serragem de madeira) pode reduzir significativamente a contaminação de milho por *Fusarium verticillioides*, sendo que a supressão da contaminação pode estar relacionada com o aumento da população microbiana no solo e conseqüentemente competição.

Figura 4 – Similaridade entre as amostras dos diferentes cultivares de milho, submetidos à adubação orgânica e mineral, provenientes da região norte do Paraná, nas safras de 2009 (A) e 2010 (B).

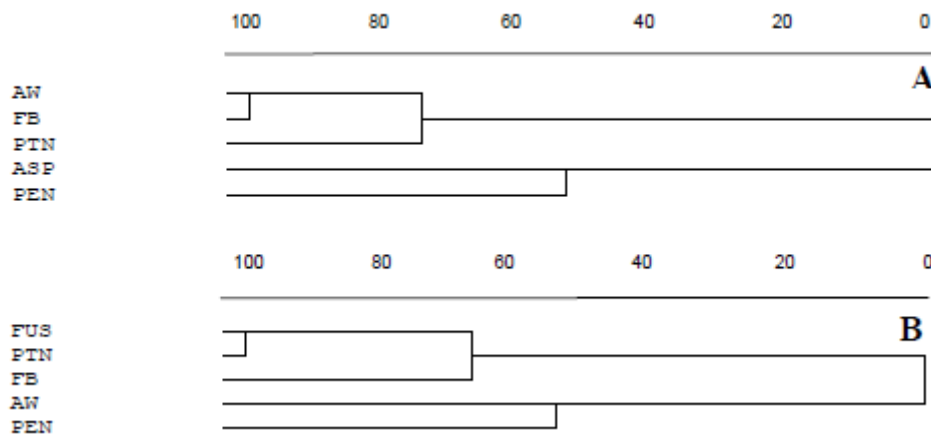


DK= DKB 390; IP= IPR 114; CA= Caiano; AS= Asteca; o= Adubação Orgânica; m= Adubação Mineral.

A análise hierárquica de grupos das variáveis demonstrando a similaridade acima de 80 % é mostrada na Figura 5. Na safra de 2009, a atividade de água e contaminação por fumonisinas (FB1 + FB2) apresentam alta similaridade (cerca de 80 %), enquanto que na

safras de 2010 a contaminação por *Fusarium* spp. e a concentração de proteína é que apresentam maior similaridade com relação às demais variáveis estudadas.

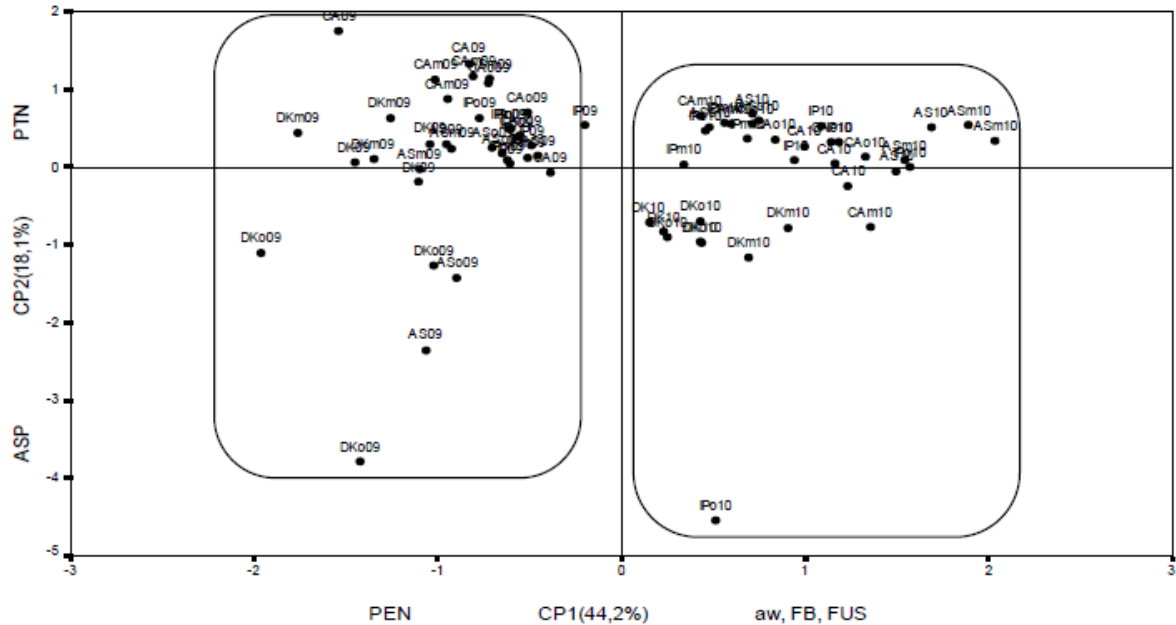
Figura 5 – Similaridade entre as variáveis *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., fumonisinas (FB1 + FB2), concentração de Proteínas e atividade de água detectadas nas diferentes cultivares de milho, submetidas à adubação orgânica e mineral, provenientes da região norte do Paraná, nas safras de 2009 (A) e 2010 (B).



FUS= *Fusarium* spp.; PEN= *Penicillium* spp.; ASP= *Aspergillus* spp.; PTN= Concentração de proteína; FB= fumonisina (FB1 +FB2), AW= Atividade de água.

A comparação dos tratamentos realizados com diferentes cultivares de milho, submetidas à adubação orgânica e mineral, nas safras de 2009 e 2010 está apresentada na Figura 6. As duas primeiras componentes principais das safras analisadas explicam 62,3 % da variância dos dados. A dispersão das amostras nas componentes principais 1 e 2 evidencia que na safra de 2009 houve maior influência da contaminação por *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e concentração de proteínas (CP2), enquanto que na safra de 2010 maior influência da atividade de água e contaminação de *Fusarium* spp. e fumonisinas (FB₁ + FB₂) (CP1), além da maior concentração de proteínas (CP2). O milho DKB 390 (DK) de ambas as safras foi menos influenciado pela contaminação por fumonisinas (FB₁ + FB₂), em relação às demais cultivares. A aplicação de fertilizantes orgânicos demonstrou maior susceptibilidade à contaminação por *Fusarium* spp. e fumonisinas (FB₁ + FB₂) em ambas as safras (2009 e 2010).

Figura 6 – Dispersão das amostras nas componentes principais 1 e 2, detectados nos diferentes cultivares de milho, submetidos à adubação orgânica e mineral, provenientes da região norte do Paraná, comparando as safras de 2009 (09) e 2010 (10).



DK= DKB 390; IP= IPR 114; CA= Caiano; AS= Asteca; o= Adubação Orgânica; m= Adubação Mineral.

A influência da prática de manejo na contaminação por fungos e micotoxinas na cultura do milho está de acordo com os dados relatados por Blandino et al. (2008), Hasegawa et al. (2008) e Ariño et al. (2009). Blandino et al. (2008) e Hasegawa et al. (2008) relataram que altas e baixas concentrações de fertilizantes nitrogenados podem causar um aumento na contaminação por *Fusarium* spp. e na produção de fumonisinas B₁ e B₂, enquanto que doses equilibradas podem reduzir essa contaminação. Ariño et al. (2009), descreveram que além das doses equilibradas de adubação nitrogenada, a utilização de cultivares resistentes pode contribuir para a redução dessa contaminação.

Os resultados indicam que a contaminação de milho por *Fusarium* spp. e fumonisinas pode ser reduzida por meio de práticas agrícolas. Porém, fatores climáticos podem influenciar diretamente na contaminação dos grãos no campo.

CONCLUSÕES

A utilização da cultivar DKB 390 com adubação mineral (NPK), proporcionou menor contaminação da cultura por fumonisinas (FB₁ + FB₂), quando

comparada à utilização de cultivares crioulos (Asteca e Caiano) com a aplicação de adubação orgânica (cama de frango) e sem a aplicação de fertilizantes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq), CNPQ/MAPA, Fundação Araucária, PPSUS/ Ministério da Saúde, Fundo Paraná/ SETI, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Tabela 4 – Contagem de bolores e leveduras, *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp., de diferentes cultivares de milho provenientes da Região Norte do Paraná (Safras 2009 e 2010).

Safr	Cultivares	<i>Fusarium</i> spp. (UFC/g)			<i>Penicillium</i> spp. (UFC/g)			<i>Aspergillus</i> spp. (UFC/g)			Contagem total de bolores e leveduras (UFC/g)	
		Amostras positivas (%)	Média	Varição	Amostras positivas (%)	Média	Varição	Amostras positivas (%)	Média	Varição	Média	Varição
2009 (n=48)	Asteca (n=12)	100	$1,6 \times 10^3$	$4,5 \times 10^2 - 3,5 \times 10^3$	100	$1,2 \times 10^6$	$2,0 \times 10^3 - 3,1 \times 10^4$	16,6	$3,0 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3 - 3,5 \times 10^3$	$1,4 \times 10^4$	$4,9 \times 10^3 - 3,4 \times 10^4$
	Caiano (n=12)	75,0	$3,8 \times 10^3$	$5,0 \times 10^1 - 2,0 \times 10^4$	100	$1,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^3 - 3,8 \times 10^4$	8,3	$5,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	$1,8 \times 10^4$	$4,5 \times 10^3 - 4,0 \times 10^4$
	IPR 114 (n=12)	83,3	$8,2 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3 - 2,1 \times 10^4$	100	$9,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3 - 2,2 \times 10^4$	33,3	$2,4 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2 - 5,0 \times 10^3$	$1,7 \times 10^4$	$4,5 \times 10^3 - 2,9 \times 10^4$
	DKB 390 (n=12)	75,0	$3,3 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2 - 8,0 \times 10^3$	100	$2,5 \times 10^6$	$6,0 \times 10^3 - 4,6 \times 10^4$	-	ND	ND	$2,7 \times 10^4$	$6,0 \times 10^3 - 5,2 \times 10^4$
2010 (n=48)	Asteca (n=12)	100	$2,6 \times 10^4$	$2,5 \times 10^3 - 7,1 \times 10^4$	58,3	$1,6 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2 - 3,5 \times 10^3$	-	ND	ND	$2,6 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3 - 7,1 \times 10^4$
	Caiano (n=12)	100	$2,1 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3 - 4,3 \times 10^4$	50,0	$6,0 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3 - 1,3 \times 10^4$	-	ND	ND	$2,3 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3 - 4,4 \times 10^4$
	IPR 114 (n=12)	100	$1,5 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2 - 4,0 \times 10^4$	75,0	$4,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3 - 1,9 \times 10^4$	-	ND	ND	$1,8 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2 - 4,0 \times 10^4$
	DKB 390 (n=12)	100	$1,6 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3 - 4,1 \times 10^4$	91,3	$2,9 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2 - 1,0 \times 10^4$	-	ND	ND	$1,8 \times 10^4$	$3,0 \times 10^3 - 5,8 \times 10^4$

n = número de amostras

ND= Não detectada.

Tabela 5 – Contagem de bolores e leveduras, *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. em milho submetido a diferentes fertilizações na Região Norte do Paraná (Safras 2009 e 2010).

Safr	Adubações	<i>Fusarium</i> spp. (UFC/g)			<i>Penicillium</i> spp. (UFC/g)			<i>Aspergillus</i> spp. (UFC/g)			Contagem total de bolores e leveduras (UFC/g)	
		Amostras positivas (%)	Média	Varição	Amostras positivas (%)	Média	Varição	Amostras positivas (%)	Média	Varição	Média	Varição
2009 (n=48)	Sem Adubação (n=16)	93,7	$5,2 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2 - 2,0 \times 10^4$	100	$1,4 \times 10^4$	$1,0 \times 10^1 - 4,2 \times 10^6$	62,5	$3,5 \times 10^3$	$3,5 \times 10^3$	$2,6 \times 10^4$	$7,0 \times 10^3 - 4,2 \times 10^4$
	Adubação Orgânica (n=16)	81,2	$4,9 \times 10^3$	$4,0 \times 10^2 - 1,2 \times 10^4$	100	$1,6 \times 10^4$	$2,0 \times 10^1 - 4,6 \times 10^4$	37,5	$2,1 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2 - 5,0 \times 10^3$	$2,5 \times 10^4$	$4,5 \times 10^3 - 4,0 \times 10^4$
	Adubação Mineral (n=16)	81,2	$2,4 \times 10^3$	$3,5 \times 10^2 - 8,5 \times 10^3$	100	$1,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^1 - 4,3 \times 10^4$	-	ND	ND	$2,3 \times 10^4$	$4,5 \times 10^3 - 4,3 \times 10^4$
2010 (n=48)	Sem Adubação (n=16)	100	$2,4 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3 - 4,7 \times 10^4$	68,7	$2,4 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3 - 8,5 \times 10^3$	-	ND	ND	$3,4 \times 10^4$	$3,0 \times 10^3 - 4,7 \times 10^4$
	Adubação Orgânica (n=16)	100	$1,6 \times 10^4$	$2,0 \times 10^2 - 5,4 \times 10^4$	81,2	$6,0 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2 - 1,9 \times 10^4$	-	ND	ND	$2,7 \times 10^4$	$2,0 \times 10^2 - 5,8 \times 10^4$
	Adubação Mineral (n=16)	100	$1,8 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2 - 7,1 \times 10^4$	62,5	$1,2 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2 - 2,5 \times 10^3$	-	ND	ND	$2,7 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2 - 7,1 \times 10^4$

n = número de amostras

ND= Não detectada

Tabela 6 – Níveis de contaminação de fumonisinas, atividade de água e concentração de proteínas de diferentes cultivares de milho provenientes da Região Norte do Paraná (Safras 2009 e 2010).

Safr	Cultivar	FB ₁ (µg/g)			FB ₂ (µg/g)			FB Total (µg/g)		Atividade de água		Proteínas	
		Amostras positivas (%)	Média	Varição	Amostras positivas (%)	Média	Varição	Média	Varição	Média	Varição	Média (%)	Varição (%)
2009 (n=48)	Asteca (n=12)	41,6	0,22	0,06 – 0,56	33,3	0,15	0,10 – 0,22	0,27	0,06 – 0,79	0,45	0,40 – 0,48	9,1	8,6 – 10,9
	Caiano (n=12)	33,3	0,17	0,03 – 0,24	25,0	0,13	0,03 – 0,19	0,21	0,03 – 0,39	0,45	0,43 – 0,49	10,6	8,3 – 11,8
	IPR 114 (n=12)	58,3	0,11	0,06 – 0,16	ND	ND	ND	0,11	0,06 – 0,16	0,47	0,45 – 0,49	9,4	8,7 – 10,5
	DKB 390 (n=12)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,43	0,40 – 0,44	8,2	7,5 – 9,3
2010 (n=48)	Asteca (n=12)	100	3,43	1,77 – 5,80	100	1,15	0,35 – 2,71	4,59	2,29 – 8,28	0,81	0,77 – 0,84	10,6	9,9 – 11,1
	Caiano (n=12)	100	2,60	1,10 – 7,82	100	0,79	0,12 – 1,72	3,04	0,33 – 6,39	0,84	0,79 – 0,86	10,0	9,1 – 11,0
	IPR 114 (n=12)	100	3,05	0,35 – 7,72	100	0,98	0,30 – 1,64	4,04	0,69 – 9,37	0,78	0,73 – 0,81	10,4	9,5 – 10,9
	DKB 390 (n=12)	100	0,54	0,35 – 0,75	100	0,35	0,20 – 0,68	0,96	0,60 – 1,42	0,82	0,77 – 0,86	7,8	7,4 – 8,8

Limite de detecção: FB1 0,0275 µg.g⁻¹; FB2 0,0353 µg.g⁻¹

n = número de amostras

ND= Não detectada.

Tabela 7 – Níveis de contaminação de fumonisinas, atividade de água e concentração de proteínas em milho submetidos a diferentes fertilizações (orgânica, mineral e sem adubação) provenientes da Região Norte do Paraná (Safras 2009 e 2010)

Safr	Adubação	Amostras positivas (%)	FB ₁ (µg/g)		Amostras positivas (%)	FB ₂ (µg/g)		FB Total (µg/g)		Atividade de água		Proteínas	
			Média	Variação		Média	Variação	Média	Variação	Média	Variação	Média (%)	Variação (%)
2009 (n=48)	Sem Adubação (n=16)	31,2	0,12	0,03 - 0,56	18,7	0,17	0,14 - 0,22	0,38	0,19 - 0,79	0,45	0,43 - 0,48	9,2	8,6 - 11,5
	Adubação Orgânica (n=16)	50,0	0,10	0,06 - 0,22	6,2	0,10	0,10	0,10	0,06 - 0,22	0,46	0,43 - 0,49	9,3	7,7 - 10,9
	Adubação Mineral (n=16)	37,5	0,04	0,06 - 0,16	6,2	0,03	0,03	0,12	0,03 - 0,20	0,44	0,40 - 0,47	9,5	8,0 - 11,1
2010 (n=48)	Sem Adubação (n=16)	100	2,22	0,51 - 3,22	100	0,91	0,20 - 2,71	3,15	0,77 - 8,28	0,82	0,76 - 0,86	9,6	7,2 - 11,1
	Adubação Orgânica (n=16)	100	2,92	0,52 - 7,72	100	0,81	0,03 - 1,75	2,18	0,76 - 9,37	0,82	0,76 - 0,86	9,7	7,4 - 10,8
	Adubação Mineral (n=16)	100	2,07	0,35 - 3,71	100	0,73	0,03 - 1,61	3,74	0,33 - 5,01	0,80	0,76 - 0,84	9,8	7,4 - 11,0

Limite de detecção: FB1 0,0275 µg.g⁻¹; FB2 0,0353 µg.g⁻¹

n = número de amostras

ND= Não detectada

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC - American Association of cereal chemists. **Approved methods of the American association of cereal chemists**. 8.ed. St. Paul: Minnesota, 1990.

ALAKONYA, A; MONDA, E. E; OWINO, P. O; AJANGA, S. Use of organic soil amendments in management of *Fusarium moniliforme*. **African Crop science Conference Proceedings**. v. 6, p. 277-281, 2003.

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 the production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 6, p. 1729-1733, 1990

ARXNO, A; HERRERA, M; JUAN,T; ESTOPANAN, G; CARRAMINANA, J. J; ROTA, C; HERRERA, A. Influence of Agricultural Practices on the Contamination of Maize by Fumonisin Mycotoxins. **Journal of Food Protection**, v.. 72, n.. 4, 2009, p. 898-902, 2009.

AWAD, WA., GHAREEB, K, BOHM, J., ZENTEK, J. Decontamination and detoxification strategies for the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation. **Food additives and contaminants**, v. 4, n. 27, p. 510-520, 2010.

BELTRAN, E; IBANEZ, M; SANCHO, J. V; HERNANDEZ, F. Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. **Rapid Communications In Mass Spectrometry**, v. 23, p. 1801-1809, 2009.

BINDER, E.M; TAN, L.M; CHIN, L.J; HANDL, J; RICHARD, J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 265-282, 2007.

BLANDINO, M; REYNERI, A; VANARA, F. Influence of Nitrogen Fertilization on Mycotoxin Contamination of Maize Kernels. **Crop Protection**, v. 27, p. 222 - 230, 2008.

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, n. 4, p. 247-251, 1995.

CALDAS, E. D; SILVA, A. C. S. Mycotoxins in Corn-Based Food Products Consumed in Brazil: An Exposure Assessment for Fumonisin. **Journal of Agricultural Applied and Environmental Microbiology Food Chemistry**, v. 55, n. 19, p. 7974-7980, 2007.

CAWOOD, M.E; GELDERBLOM, W.C.A; VLEGGGAAR, R. Isolation of the Fumonisin Mycotoxins: A Quantitative Approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 1958 - 1962, 1991.

CONN, K. L; LAZAROVITS, G. Impact of animal manures on verticillium wilt potato scab, and soil microbial population. **Crop Protection and food Research**. v. 21, p. 81-92, 1999.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisas de Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Rio de Janeiro, 1999.

EL FARESI, W. A. **Estudo interativo entre o emprego da cama de frango como ração para bovinos em confinamento e a ocorrência de botulismo.** São Paulo: Edusp, 1995.

FORNAZIERI FILHO, A. J. **Manual Brasil agrícola: principais produtos agrícolas.** – São Paulo, 2007. 527p.

GELINEAU-VAN, W; 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.

GELDERBLOM, W.C.A; RHEEDER,J.P; LEGOTT, N. Fumonisin contamination of a corn sample associated with the induction of hepatocarcinogenesis in rats - role of dietary deficiencies. **Food and Chemical Toxicology**, p. 471- 479, 2004.

JOUANY, J; YIANNIKOURIS, P; BERTIN, A, G. The chemical bonds between mycotoxins and cell wall components of *Saccharomyces cerevisiae* have been identified. **Archiva Zootechnica**, v.8, p. 26-50, 2005.

HASSEGAWA, R.H; FONSECA, H; FANCELLI, A.L; SILVA, V.N; SCHAMMASS, E.A; REIS, T.A; CORREA, B. Influence of Macro and Micronutrient Fertilization on Fungal Contamination and Fumonisin Production in Corn Grains. **Food Control**, v.19, p.36 - 43, 2008.

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.

IAPAR. Cartas climáticas básicas do Estado do Paraná. Londrina: **Instituto Agrônômico do Paraná**, 1987.

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** ., 77: 517-521, 1994.

MARASAS, W.F.O. Discovery and Occurrence of the Fumonisin: A Historical Perspective. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 239 - 243, 2001.

MARIN, 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. **Letters in Applied Microbiology**. v.21, n. 5, p. 298-301, 1995.

MENEZES, R; IGNACIO S. C; SALCEDO, H. Mineralização de N após incorporação de fertilizantes orgânicos em um Neossolo Regolítico cultivado com milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.11, n.4, p.361-367, 2007.

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** 116, 220-226, 2009.

NELSON, P.E; TOUSSON, T.A; MARASAS, W.F.O. *Fusarium* species - An illustrated manual for identification. Pennsylvania: **Pennsylvania State University Press**, 1983.

- ONO, E. Y. S; SILVA, M; HASHIMOTO, E. H; VIZONI, E; KAWAMURA, O; SUGIURA, Y; HIROOKA, E. Y. Mycotoxicological quality evaluation of corn samples used by processing industries in the Northern region of Paraná State, Brazil. **Food Additives e Contaminants**. v. 25, p.1392 - 1399, 2008.
- ONO, E.Y.S.; SUGIURA, Y.; HOMECHIM, M.; KAMOGAE, M.; VIZZONI, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, v.147, p.139-148, 1999.
- OSUNLAJA, S.O. Effect of organic soil amendments on the incidence of stalk rot of maize. **Plant and Soil**, The Hague, v.127, p.237-241, 1990.
- 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.
- PEDROSA, A.V.B; DEZEN, R.B. O milho: características do mercado e perspectivas. **Preços agrícolas**, v.55, p.1-4, 1991.
- REID, L. M; NICOL, R. W; OUELLET, T; SAVARD, M. J; MILLER, D; YOUNG, J. C; STEWART, D. W; SCHAAF SMA, A. W. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in Maize Ears: Disease Progress, Fungal Biomass, and Mycotoxin Accumulation. **Phytopathology**. v.. 89, n. 11, p. 1028-1037, 1999.
- ROCHA, L. O; NAKAI, V. K; BRAGHINI, R; REIS, T. A; KOBASHIGAWA, E; CORREA, B. Mycoflora and Co-Occurrence of Fumonisins and Aflatoxins in Freshly Harvested Corn in Different Regions of Brazil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 11, p. 5090-5103, 2009.
- SADLER, T.W; MERRILL, ALFRED H; STEVENS, V. L; SULLARDS, M; WANG, C; WANG, E. Prevention of Fumonisin B₁ - Induced Neural Tube Defects by Folic Acid. **Teratology**, n. 66, p. 169-176 , 2002.
- SAMSON, R.A; HOESKSTRA, E.S; FRISVAD, J.C; FILTENBORG, O. Occurrence of Food-Borne Fungi and Factors for Growth. In: _____. **Introduction to food-borne fungi**. 4.ed. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures. p.243-250, 1995.
- SANTOS, C.C; BELLINGIERI, P.A; FREITAS, J.C. Efeito da aplicação de compostos orgânicos de cama de frango nas propriedades químicas de Latossolo Vermelho Escuro cultivado com sorgo granífero. **Científica**, v. 32, no. 2, p.134-140, 2004.
- 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.
- SINGH, K; FRISVAD, J.C; THRANE, U; MATHUR, S.B. An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins. Hellerup/Denmark/: **Danish Government**, 1991.
- SYDENHAM, E. W; THIEL, P. G; MARASAS, W. F. O; SHEPHARD, G. S., SCHALKWYK, D. J. Van, KOCH, 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, n. 10, pp 1900-1903, 1990.

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 fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. **Mycotoxin Research**, v.9, p.27-34, 1993.

UENO, Y.; IJIMA, K., WANG, S-D.; SUGIURA Y.; SEKIJIMA, M.; TNAKA, T.; CHEN,C.; YU, S-Z. Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: A 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. **Fd. Chem. Toxicol**, v.35, p.1143-1150, 1997.

WHO - World Health Organization. **Fumonisin Bi**. Geneva, 2000.

ZECH, W; SENESI, N; GUGGENBERGER, G; KAISER, K; LEHMANN, J; MIANO, T.M; MILTNER, A, SCHROTH, G. Factor controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. **Geoderma**, v. 79, p. 117-161, 1997.

FONTES DE FÓSFORO ASSOCIADAS A INOCULAÇÃO COM *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* NA CONTAGEM FÚNGICA E CONTAMINAÇÃO POR FUMONISINAS EM MILHO

RESUMO: O trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes fontes de fertilizantes fosfatados (superfosfato triplo, fosfato de gafsa, fosfato de itafós e a mistura superfosfato triplo e fosfato de gafsa, superfosfato triplo e fosfato de itafós e testemunha) com e sem a aplicação de inoculante (*Pseudomonas fluorescens*) na contaminação do milho por fungos e fumonisinas, atividade de água e teor de proteínas. O experimento foi conduzido sob delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial 6x2, com 12 tratamentos e quatro repetições, totalizando 48 parcelas. Os resultados foram avaliados por Análise Estatística de Componentes Principais (ACP). *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. foram detectados em 77 % e 75 % das amostras, respectivamente. As maiores médias de *Fusarium* spp. foram detectadas nos tratamentos testemunha, com $(2,6 \times 10^4 \text{ UFC/g})$ e sem $(3,4 \times 10^4 \text{ UFC/g})$ a aplicação de inoculante (*P. fluorescens*). A FB₁ e FB₂ foram detectadas em 100 % e 75 % das amostras, respectivamente. As maiores médias de fumonisinas (FB₁+ FB₂) foram detectadas nos tratamentos sem *P. fluorescens* (de 0,18 a 1,12 Mg/g), enquanto que os tratamentos com a aplicação de *P. fluorescens* resultaram em menor média de contaminação por fumonisinas (de 0,08 a 0,83 Mg/g). Quanto aos diferentes fosfatos, as menores contaminações por fumonisinas (0,17 Mg/g) foram detectadas nos tratamentos com a aplicação do fosfato solúvel (Superfosfato triplo). Quando aplicado simultaneamente, as rizobactérias promotoras de crescimento (*P. fluorescens*) e fontes de fertilizantes solúveis (Superfosfato triplo) promoveram a redução da contaminação por fungos e fumonisinas na cultura do milho.

Palavras-Chave: Fumonisinas. Adubação fosfatada. Rizobactérias. *Pseudomonas fluorescens*.

INTRODUÇÃO

Fusarium verticillioides, um patógeno comumente encontrado na cultura do milho, cujo crescimento é favorecido pelo clima subtropical predominante no Brasil (1), é responsável pela produção de fumonisinas (2, 3).

Fumonisinas, micotoxinas derivadas de policetídeos, podem ser classificadas em quatro grupos A, B, C e P (4, 5). A fumonisina B₁ (FB₁) é o metabólito mais abundante, representando 70 % das fumonisinas detectadas em alimentos e rações naturalmente contaminados, seguido de fumonisina B₂ (FB₂) e B₃ (FB₃) (6).

A FB₁ tem sido associada a micotoxicoses, como leucoencefalomalacia em equinos (7), edema pulmonar em suínos (8), hepatocarcinoma (9) e defeitos no tubo neural em ratos (10) e seres humanos (11). Na África do Sul, o consumo humano de milho contaminado foi relacionado ao surgimento de câncer esofágico (12, 13) e na China, ao câncer hepático (14).

A principal estratégia para minimizar a contaminação de cereais por micotoxinas é a boa prática agrícola (15). No campo, o controle da contaminação de grãos é realizado por meio da aplicação de insumos químicos, que resultam em vários efeitos negativos, como o desenvolvimento da resistência de patógenos aos agentes químicos, ação em microrganismos não-alvo que induzem ao desequilíbrio da microbiota do solo, e impactos ambientais, como a poluição de corpos de água subterrâneos (16, 17). Portanto, a utilização de microrganismos (fungos e bactérias) para redução do uso de produtos químicos na agricultura e proteção da cultura contra contaminação por patógenos é uma alternativa promissora.

Um considerável número de bactérias com capacidade de interagir com a rizosfera (rizobactérias) exercem benefícios para as plantas por meio da produção de fitormônios que auxiliam no crescimento da planta, fixação de nitrogênio, bem como a solubilização do fosfato inorgânico, mineralização da matéria orgânica fosfatada e a redução ou prevenção dos efeitos deletérios de microrganismos patogênicos, principalmente devido à síntese de substâncias antimicrobianas ou sideróforas (compostos de baixa massa molecular, quelantes de ferro, produzidos pelas bactérias sob condições limitantes desse elemento) (18). Dentre esses microrganismos, *Pseudomonas* spp. é um gênero que recebe grande atenção, devido à capacidade de estimular a germinação de sementes, solubilizar o fosfato presente no solo, promover o crescimento de plantas e proteger contra a contaminação de microrganismos patogênicos, além de aumentar significativamente o rendimento das culturas (16, 19).

O fósforo, um nutriente exigido no cultivo do milho durante todo ciclo da cultura, desempenha papel fundamental no metabolismo da planta, atuando na transferência e na utilização de ATP, além de ser constituinte de vários compostos vitais ao metabolismo vegetal como fitina, lecitina e nucleotídeos (20). As fontes de fósforo podem ser classificadas em solúveis e insolúveis (naturais). Fontes de fosfato solúveis, quando adicionadas ao solo, aumentam rapidamente a concentração do fósforo na solução do solo, porém têm sua eficiência diminuída ao longo do tempo devido ao processo de "adsorção" ou "fixação" de fosfato. Fontes de fosfato naturais dissolvem-se lentamente na solução do solo e tendem a aumentar a disponibilidade desse nutriente para as plantas com o tempo. Baixos níveis de fósforo no solo podem diminuir a síntese de fosfolipídios das raízes das plantas, resultando em aumento da permeabilidade da membrana celular e exsudação radicular, influenciando na incidência de patógenos, enquanto altos níveis podem reduzir a contaminação (21).

Considerando os efeitos benéficos da interação entre *Pseudomonas* spp. e a rizosfera e a importância da adubação fosfatada na cultura do milho quanto à resistência a patógenos toxigênicos como *Fusarium* spp., bem como os poucos trabalhos relacionados ao

sinergismo de adubos fosfatados e *Pseudomonas* spp., o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação de diferentes fontes de fertilizantes fosfatados com e sem a aplicação de inóculante (*P. fluorescens*) no controle da contaminação da cultura de milho por fungos toxigênicos e fumonisinas, atividade de água e teor de proteínas.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização da Área

O experimento foi desenvolvido na Fazenda Experimental (FAZESC) da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, situada a uma latitude de 23°23' S, longitude de 51°11' W e altitude de 566 metros. Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Cfa (C - clima temperado; f - clima úmido, com precipitação durante todos os meses do ano e inexistência de estação seca definida; a - verão temperado), com precipitação total anual de 1605 mm, podendo haver um período de seca no inverno com baixa incidência de geadas intensas (22). A temperatura média anual é de 21°C. O solo é tipicamente latossolo vermelho distroférico (23).

Condução Experimental

O experimento foi conduzido sob delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial 6x2, com 12 tratamentos e quatro repetições, totalizando 48 parcelas. Foram avaliados a combinação de seis diferentes fontes de fosfato, sendo Testemunha (TSA), Superfosfato triplo (SFT), Fosfato de Gafsa (GAFSA), Fosfato Itafós (ITAFÓS), Superfosfato triplo e Fosfato de Gafsa (SFT+GAFSA), Superfosfato triplo e Fosfato Itafós (SFT+ITAFÓS), com dois níveis de inoculação de *Pseudomonas fluorescens* via semente (com e sem) (Tab. 1).

[Inserir tabela 1]

As sementes da cultivar Mon 810 utilizada no experimento, foram tratadas com o fungicida Maxim[®] XL (Fludioxonil e Metalaxil-M), 100 mL/ha de Rizofós[®] (*P. fluorescens*), contendo a Estirpe 1008 (coleção de culturas da Rizobacter Argetina S.A.) na concentração de 10⁻⁸ células g⁻¹ (inoculante) e 40 mL ha⁻¹ de Premax R (protetor).

As parcelas foram constituídas por seis linhas de cinco metros de comprimento com espaçamento de 0,9 m entre elas. Foram desconsideradas as duas linhas laterais e 0,5 m das extremidades das mesmas, tornando a área útil total de cada parcela com 10,8 m².

Na adubação de semente foram aplicados 60 kg/ha de K₂O. Para os tratamentos de fosfato, foram utilizados 120 kg/ha de P₂O₅, enquanto que nos tratamentos em que houve mistura (SFT+GAFSA e SFT+ITAFÓS), foram utilizados 60 Kg/ha de P₂O₅ para cada fonte do nutriente. A fonte de P solúvel (SFT) foi aplicada diretamente no sulco de semente, e as fontes naturais (GAFSA e ITAFÓS) foram aplicadas a lanço na superfície, sem incorporação. Quando houve a aplicação conjunta, a forma de aplicação foi realizada individualmente para cada fonte de fosfato, conforme descrito anteriormente.

Aos 10 dias após a emergência (DAE) foi realizado o raleio do excesso de plantas, formando uma população de 50 mil plantas por hectare. A adubação nitrogenada de cobertura foi realizada em duas etapas, uma no estágio V4 (4 folhas desenvolvidas) e outra no V6 (6 folhas desenvolvidas), utilizando uréia com aplicação e incorporação total de 100 kg ha (50 kg/ha cada) para todos os tratamentos. O controle de plantas daninhas durante o ciclo da cultura foi realizado por meio de cultivador e capina manual. A cultivar MON 810 expressa a proteína Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Spodoptera frugiperda*, possibilitando eficiente controle da praga. Portanto, não houve necessidade de realizar aplicações de inseticidas e fungicidas durante o seu estágio vegetativo.

A colheita foi realizada manualmente, sendo obtidas da produção total da área útil da parcela 10 espigas colhidas ao acaso para análise de contaminação fúngica e fumonisinas. A debulha do milho foi realizada manualmente e as amostras foram armazenadas em câmara fria para posteriores análises.

Avaliação da Microbiota Fúngica

Duzentos gramas de milho de cada repetição de campo foram triturados até granulometria de 50 "mesh" e homogeneizados. Uma alíquota de 10 g de milho triturado foi homogeneizada em 90 mL de água peptonada estéril 0,1 % (v/v) e submetida a diluições seriadas em tubos contendo 9,0 mL do mesmo diluente até fator 10⁻⁵. Uma alíquota de 1 mL de cada diluição foi transferida para placas de Petri (em duplicata) contendo ágar batata dextrosado (BDA - pH 4,0) adicionados de 50 µg/mL de cloranfenicol e incubados a 25 °C por 6 dias, procedendo-se à contagem e identificação dos gêneros (24, 25,26).

Determinação de Fumonisinias

Para extração de fumonisinias, uma alíquota de 10 g de milho triturado de cada repetição de campo foi adicionada a 30 mL de metanol:água (3:1, v/v), mantida em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente, seguida de agitação a 150 r.p.m. por 30 minutos. A suspensão foi centrifugada a 4500 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi submetido à pré-limpeza em minicoluna de troca aniônica Sep-Pak accell plus QMA (Waters Co., Ltda), previamente acondicionada com 6 mL de metanol:água (3:1, v/v) seguida de 3 mL de metanol, sendo as fumonisinias eluídas com 10 mL de ácido acético 0,5 % em metanol. O eluato foi seco a 45 °C, o resíduo dissolvido em 800 uL de metanol:água (3:1, v/v), a seguir fracionado em alíquotas de 200 uL e novamente secos sob fluxo de gás N₂ a 45 °C, procedendo-se ao acondicionamento em freezer (-20 °C) para posterior análise de fumonisinias.

A determinação de fumonisinias (FB1 e FB2) foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo o método de Shephard et al. (27) modificado por Ueno et al. (28). A alíquota de 200 uL seca sob nitrogênio foi redissolvida em acetonitrila:água (1:1, v/v) e submetida à derivatização com 200 uL de o-ftaldialdeído (OPA) (40 mg de OPA, 1 mL de metanol, 5 mL de tetraborato de sódio a 0,1M e 50 uL de 2-mercaptoetanol), injetado dentro de 1 minuto em cromatógrafo líquido de alta eficiência - CLAE (sistema isocrático de fase reversa) consistindo de uma bomba Shimadzu LC-10 AD, detector de fluorescência RF-10A XL e, coluna C18 Nucleosil 100-5 (4,6 x 250 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co.). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram de 335 nm e 450 nm, respectivamente. A fase móvel consistiu de CH₃OH:NaH₂PO₄ 0,1 mol/L (80:20, v/v) ajustado para pH 3,3 com ácido orto-fosfórico. O fluxo foi de 1 mL/min e temperatura de forno constante a 25 °C. Os limites de detecção foram de 27,5 ng/g para FB₁ e de 35,3 ng/g para FB₂.

Determinação da Atividade de Água

A atividade de água dos grãos de milho triturados (50 mesh) foi determinada utilizando o equipamento Aqualab CX-2 (Decagon Devices Inc., Pullman, Washington).

Determinação de Proteínas

A concentração de nitrogênio total foi determinada pelo método de Kjeldahl (29), utilizando o fator de conversão 6,25 para obtenção da concentração de proteína total do milho.

Análise Estatística

A Análise de Componentes Principais (ACP) é um método útil de ordenação para a descrição do conjunto de dados, e tem sido utilizada na comparação da contaminação de milho por micotoxinas produzidas por *Fusarium* spp. quando se tem uma grande quantidade de dados. Esse método reduz a variabilidade de um grupo complexo de dados, apresentando-o de forma facilmente interpretável, sendo, portanto, ideal para a verificação da capacidade de discriminação das variáveis no processo de formação de agrupamentos de cultivares de milho em relação à adubação

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A frequência relativa dos principais gêneros fúngicos detectados em 48 amostras de milho, submetidas a diferentes tratamentos com adubação fosfatada, com e sem aplicação de *Pseudomonas fluorescens*, da Região Norte do Paraná (Safrá 2010), está representada na Tab. 2. *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. foram os gêneros prevalentes, sendo detectados em 77 % e 75 % das amostras, respectivamente, enquanto que *Aspergillus* spp. não foi detectado nas amostras analisadas. A ausência de *Aspergillus* spp. pode estar relacionada à incidência de *Fusarium* spp., uma vez que existe uma correlação negativa entre esses gêneros, relacionada à competição por nutrientes e espaço físico para o crescimento micelial (30, 31).

[Inserir tabela 2]

A contagem dos principais gêneros fúngicos detectados em amostras de milho submetidas a tratamentos com adubação fosfatada (TSA, SFT, GAFSA, ITAFÓS, SFT+GAFTA, SFT+ITAFÓS), com e sem aplicação de *Pseudomonas fluorescens*, na Região Norte do Paraná (safrá 2010, n=48), está apresentada na Tab. 3. As maiores médias das contagens de contaminação por *Fusarium* spp. foram detectadas nos tratamentos TSA, com

($2,6 \times 10^4$ UFC/g) e sem ($3,4 \times 10^4$ UFC/g) a aplicação de inoculante (*P. fluorescens*), enquanto as menores médias foram detectadas nos tratamentos GAFSA sem *P. fluorescens* ($1,0 \times 10^3$ UFC/g) e no tratamento ITAFÓS com *P. fluorescens* ($1,0 \times 10^3$ UFC/g). As amostras de milho que foram submetidas aos demais tratamentos, com e sem inoculante, apresentaram média de contaminação por *Fusarium* spp. na ordem de grandeza de 10^3 UFC/g. Em relação a *Penicillium* spp., a maior média de contaminação (10 UFC/g) ocorreu nos tratamentos ITAFÓS sem a aplicação do inoculante ($7,6 \times 10^3$ UFC/g) e SFT+ITAFÓS com a aplicação de *P. fluorescens* ($6,9 \times 10^3$ UFC/g), enquanto que a menor média de contaminação ocorreu nos tratamentos GAFSA ($1,3 \times 10^2$ UFC/g) e SFT+GAFSA ($1,5 \times 10^2$ UFC/g) sem aplicação de *P. fluorescens* e SFT ($1,4 \times 10^2$ UFC/g) com aplicação de *P. fluorescens*. A média de contagem total de bolores e leveduras variou de $1,0 \times 10^3$ (GAFSA) a $3,4 \times 10^4$ UFC/g (Testemunha).

[Inserir Tabela 3]

Os níveis de fumonisinas, atividade de água e teor de proteínas dos diferentes tratamentos de adubação fosfatada (TSA, SFT, GAFSA, ITAFÓS, SFT e GAFSA, SFT e ITAFÓS), com e sem aplicação de *P. fluorescens* na safra de 2010, da Região Norte do Paraná, estão representados na Tab. 4. A FB₁ foi detectada em 100 % das amostras, enquanto que FB₂ em 75 % das amostras. As maiores médias de contaminação por fumonisinas (FB₁+FB₂) foram detectadas nos tratamentos sem *P. fluorescens* (de 0,18 a 1,12 Mg/g), enquanto que os tratamentos com a aplicação de *P. fluorescens* apresentaram a menor média de contaminação por fumonisinas (de 0,08 a 0,83 Mg/g). Todas as amostras apresentaram níveis de fumonisinas abaixo do limite máximo permitido pela U. S. Food and Drug Administration (32).

[Inserir Tabela 4]

Na análise estatística multivariada, as duas primeiras componentes principais obtidas dos tratamentos com diferentes adubações fosfatadas, com e sem aplicação de inoculante (*P. fluorescens*), explicam 60,2 % da variância dos dados. A configuração em duas dimensões representada no gráfico dos escores das componentes principais 1 e 2, demonstrou que os fertilizantes fosfatados naturais (GAFSA, ITAFÓS), a mistura dos fosfatos solúvel e natural (SFT-ITAFÓS) e a testemunha (TSA) tratados com e sem a aplicação do

inoculante (*P. fluorescens*) apresentaram maior contaminação de milho por *Fusarium* spp. e fumonisinas (B₁ e B₂) na CP1 e da contaminação de *Penicillium* spp. e concentração de proteínas na CP2. As menores contaminações foram detectadas nos tratamentos com fosfato solúvel superfosfato triplo (SFT) com a aplicação de *P. fluorescens* (Fig. 1). Estudos tem demonstrado a eficácia de diferentes fontes fosfatadas na raiz do milho e feijão na redução da contaminação por *Fusarium* spp., entre eles o Superfosfato Triplo combinado com Nitrato de Cálcio e Amônio, Mavuno e esterco de boi. O tratamento com fertilizante Mavuno, seguido do Superfosfato Triplo (fonte solúvel) combinado com Nitrato de Cálcio e Amônio apresentou menor contaminação por *Fusarium* spp. na raiz e no solo (33). Korndorfer et al. (34), Horawitz e Meurer (35) e Sousa e Lobato (36) relatam que as fontes de fosfatos mais solúveis proporcionam maior disponibilização de nutrientes no solo no ano de aplicação, enquanto que os fosfatos naturais apresentam menor eficiência inicial, entretanto com o tempo, as diferenças entre as fontes tendem a diminuir. Os baixos níveis de fósforo nas fases iniciais podem diminuir a síntese de fosfolipídios das raízes das plantas, resultando em aumento da permeabilidade da membrana celular e exsudação radicular, influenciando na incidência de patógenos, enquanto que altos níveis podem reduzir a contaminação (21). Os resultados obtidos neste estudo (Fig. 1) estão de acordo com Fidelis et al. (37) que verificaram a suscetibilidade de híbridos de milho a *Phaeosphaeria maydis*, cultivados em solo com diferentes níveis de fósforo (25 e 113 Kg/ha de P₂O₅) no sul do estado do Tocantins. As doses elevadas de fósforo (113 Kg/ha de P₂O₅) promoveram a redução da incidência de *P. maydis*.

[Inserir Figura 1]

A maior contaminação por *Fusarium* spp. e fumonisinas nos tratamentos sem a aplicação de *P. fluorescens*, em contraste com o tratamento com *P. fluorescens*, pode estar relacionada com a promoção do crescimento das raízes, induzido por essa rizobactéria (16, 19). O provável mecanismo de ação envolvido consiste na secreção do fitormônio Ácido indol-3-acético (AIA) por *P. fluorescens* (38), que promove o aumento da superfície de absorção da raiz proporcionando maior disponibilidade de nutrientes para a planta, podendo desta forma favorecer a resistência da planta à contaminação por patógenos presentes no solo (39, 40). Adicionalmente, com a aplicação do inoculante pode ter ocorrido a produção de substâncias antimicrobianas por *P. fluorescens*, além de disponibilização de maiores quantidades de fósforo para a planta (18), aumentando a resistência da raiz contra

contaminação por microrganismos patogênicos (22, 37) e conseqüentemente à produção de micotoxinas.

A aplicação de *Pseudomonas* spp., combinada com doses adequadas de fertilizantes resulta em melhor desenvolvimento da planta (41). A aplicação de *P. fluorescens* no cultivo de tomates reduziu a contaminação por *Fusarium* spp. em 30 % a 65 %, comparado ao controle, sendo possivelmente a redução da contaminação atribuída à competição entre os microrganismos, tanto por nutrientes, como pela colonização da raiz hospedeira. No entanto, o mecanismo de ação não foi totalmente esclarecido (42). Alguns autores constataram que a aplicação de *Pseudomonas* spp. e *Rhizobium leguminismarum*, juntamente com uma fonte de fertilizante superfosfato simples (P₂O₅) em uma cultura de trigo, aumentou significativamente o crescimento da raiz, altura da planta, comprimento das espigas, rendimento dos grãos, teor de fosfato nas sementes e teor de carboidratos das folhas, proporcionando um rendimento de 30 a 40 % superior, quando comparado com o tratamento somente com a fonte de fertilizante fosfatado (43).

As médias de atividade de água dos diferentes tratamentos de adubação fosfatada variaram de 0,76 a 0,81, sendo que o tratamento SFT+ITAFÓS sem *P. fluorescens* apresentou menor atividade de água (0,76), enquanto que a maior atividade de água (0,81) foi detectada nos tratamentos TSA, SFT, GAFSA, ITAFÓS com *P. fluorescens* e ITAFÓS e SFT+GAFSA sem *P. fluorescens*. Considerando que em atividade de água de 0,85 a 0,86 não ocorre a produção de fumonisina B₁, os resultados (Tab. 3) sugerem que a produção dessa micotoxina pode ter ocorrido no campo, antes do período de colheita do milho (44).

O teor de proteínas nas amostras de milho variou de 7,10 % a 9,89 %. A maior média de proteínas foi detectada no tratamento SFT+ITAFÓS sem *P. fluorescens* (9,26 %) e a menor média no tratamento GAFSA com *P. fluorescens* (8,04 %). A contaminação por fumonisinas não apresentou relação com os teores de proteínas detectados.

Alguns autores relataram que não houve correlação entre o teor de proteínas do milho e a contaminação do grão por *Fusarium* spp. (45, 46). Entretanto, neste experimento a contaminação por *Penicillium* spp. e o teor de proteína estavam relacionados de forma positiva, além da correlação entre *Fusarium* spp. e fumonisinas (B₁ + B₂). Esses resultados são demonstrados na análise de similaridade acima de 60 % na Fig. 3. Quando avaliada a similaridade de 90 %, pode-se observar somente a relação entre as variáveis *Fusarium* spp e fumonisinas (B₁ + B₂).

[Inserir Figura 2]

A análise de grupos revelou, para um grau de similaridade de 90 %, pequenos grupos que foram separados quanto à contaminação por *Fusarium* spp., fumosininas (B₁ + B₂) e *Penicillium* spp., representados no dendrograma na Fig. 2. É possível confirmar por esta análise, que os diferentes tratamentos, com e sem a aplicação do inoculante demonstraram diferenças quanto a contaminação por *Fusarium* spp. e fumonisinas (B₁ + B₂).

[Inserir Figura 3]

Os resultados indicaram que a contaminação do milho por *Fusarium* spp. e fumonisinas pode ser reduzida por meio de práticas agrícolas alternativas, como a aplicação de rizobactérias promotoras de crescimento (*P. fluorescens*), simultaneamente com fontes de fertilizantes fosfatados solúveis, como o superfosfato triplo. Entretanto, mais estudos são requeridos, a fim de detectar se as fontes de fertilizantes fosfatados menos solúveis podem proporcionar respostas semelhantes ou superiores aos resultados obtidos neste experimento, em safras consecutivas, de forma a reduzir a contaminação por fumonisinas no campo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq), CNPQ/MAPA, Fundação Araucária, PPSUS/ Ministério da Saúde, Fundo Paraná/ SETI, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SYDENHAM, E.W; SHEPHARD, 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.
2. MARASAS, W.F.O. Discovery and Occurrence of the Fumonisin: A Historical Perspective. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 239 - 243, 2001.
3. CAWOOD, M.E; GELDERBLUM, W.C.A; VLEGGGAAR, R. Isolation of the Fumonisin Mycotoxins: A Quantitative Approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 1958 - 1962, 1991.

4. MUSSER, S.M; GAY, M.L; MAZZOLA, E.P; PLATTNER, R.D. Identification of a New Series of Fumonisin Containing 3-Hydroxypyridine. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 970 - 972, 1997.
5. SEO, J.A; LEE, Y.W. Natural occurrence of the C Series of Fumonisin in Moldy Corn. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1331 - 1334, 1998.
6. GELDERBLUM, 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**, Oxford, v.12, n.1-2, p.1247-1251, 1991.
7. KELLERMAN, T. S; MARASAS, W. F. O; THIEL, P. G; GELDERBLUM, W. C. A; CAWOOD, M; COETZER, J. A. W. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B₁. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 269 - 275, 1990.
8. 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.
9. GELDERBLUM, W.C.A; RHEEDER,J.P; LEGOTT, N. Fumonisin contamination of a corn sample associated with the induction of hepatocarcinogenesis in rats - role of dietary deficiencies. **Food and Chemical Toxicology**, p. 471- 479, 2004.
10. SADLER, T.W; MERRILL, ALFRED H; STEVENS, V. L; SULLARDS, M; WANG, C; WANG, E. Prevention of Fumonisin B₁ - Induced Neural Tube Defects by Folic Acid. **Teratology**, n. 66, p. 169-176 , 2002.
11. WAES, G. 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. 146-153, 2009.
12. WHO - World Health Organization. **Fumonisin B₁**. Geneva, 2000.
13. SYDENHAM, E. W; THIEL, P. G; MARASAS, W. F. O; SHEPHARD, G. S., SCHALKWYK, D. J. Van, KOCH, K. R. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. . **Agric. Food Chem.** v. 38, n. 10, pp 1900-1903, 1990.
14. UENO, Y.; IJIMA, K., WANG, S-D.; SUGIURA Y.; SEKIJIMA, M.; TNAKA, T.; CHEN,C.; YU, S-Z. Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: A 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. **Fd. Chem. Toxicol**, v.35, p.1143-1150, 1997.
15. AWAD, WA., GHAREEB, K, BOHM, J., ZENTEK, J. Decontamination and detoxification strategies for the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation. **Food additives and contaminants**, v. 4, n. 27, p. 510-520, 2010.

16. DE WEGER, L. A; BIJ, A. J. V; DEKKERS, L. C; SIMONS, M; WIJFFELMAN, C. A; LUGTENBERG, B. J. J. Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant-beneficial *Pseudomonads*. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 17, p. 221-228, 1995.
17. GERHARDSON, B. Biological substitutes for pesticides. **TRENDS in Biotechnology**. v. 20, n. 8, p. 338-343, 2002.
18. RODRIGUES, H; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 319-339, 1999.
19. LEMANCEAU, P. Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes: exemple des *Pseudomonas spp fluorescents*. **Agronomie**. v. 12, p. 413-437, 1992.
20. FORNAZIERI, A. J. **Manual Brasil agrícola: principais produtos agrícolas**. – São Paulo, 2007.
21. ZAMBOLIM, L. **Sementes: qualidade fitossanitária**. 1.ed. Viçosa: UFV, 2005. 502p.
22. IAPAR. Cartas climáticas básicas do Estado do Paraná. Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná, 1987.
23. EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisas de Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Rio de Janeiro, 1999.
24. NELSON, P.E; TOUSSON, T.A; MARASAS, W.F.O. *Fusarium* species - An illustrated manual for identification. Pennsylvania: **Pennsylvania State University Press**, 1983.
25. SINGH, K; FRISVAD, J.C; THRANE, U; MATHUR, S.B. An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins. Hellerup/Denmark/: **Danish Government**, 1991.
26. SAMSON, R.A; HOESKSTRA, E.S; FRISVAD, J.C; FILTENBORG, O. Occurrence of Food-Borne Fungi and Factors for Growth. In: _____. **Introduction to food-borne fungi**. 4.ed. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures. p.243-250, 1995.
27. 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.
28. 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 fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. **Mycotoxin Research**, v.9, p.27-34, 1993.
29. AACC - American Association of cereal chemists. **Approved methods of the American association of cereal chemists**. 8.ed. St. Paul: Minnesota, 1990.
30. MARIN, 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 *Fusarium moniliforme* on maize grain. **Letters in Applied Microbiology**. v.21, n. 5, p. 298-301, 1995.

31. LILLEHOJ, E.B. Feed sources and conditions conducive to production of aflatoxin, ochratoxin, *Fusarium* toxins and zearalenone. *JAVMA*, 163 (11): 1281-1284, 1973.
32. FAO- Food and Agriculture Organization (2001). **An introduction to mycotoxins**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/005/Y1390E/y1390e04.htm#bm04.4>>. Acesso em: 11 nov. 2009.
33. OKOTH, S; SIAMETO, E. Suppression of *Fusarium* spp. in a maize and beans intercrop by soil fertility management. **Journal of Yeast and Fungal Research**. v. 1, n. 2, p. 35-43, 2010.
34. KORNDORFER, G. H; LARA-CABEZAS, W. A; HOROWITZ, N. Eficiência agronômica de fosfatos naturais reativos na cultura do milho. **Science and agriculture**, v. 56, n. 2, 1999.
35. HOROWITZ, N; MEURER, E.J. Eficiência agronômica de fosfatos naturais. In: **Simpósio Sobre Fósforo na Agricultura Brasileira**, Piracicaba, 2003. Anais. Piracicaba, Potafos/Anda, 2003. 24p.
36. SOUSA, D.M.G; LOBATO, E. **Adubação fosfatada em solos da região do Cerrado**. Piracicaba, Potafos, 2003. 16p.
37. FIDELIS, R. R; MIRANDA, G. V; AFFERRI, S. F; PELUZIO, J. M. Reação de cultivares de milho a *Phaeosphaeria maydis* sob estresse de fósforo, no estado do Tocantins. **Amazônia: Ciência e Desenvolvimento**, v.2, n.4, jan./jun. 2007.
38. PATTEN, C. L. GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, n. 8, p. 3795-3801, 2002.
39. REID, L. M; NICOL, R. W; OUELLET, T; SAVARD, M. J; MILLER, D; YOUNG, J. C; STEWART, D. W; SCHAAFSMA, A. W. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in Maize Ears: Disease Progress, Fungal Biomass, and Mycotoxin Accumulation. **Phytopathology**. v.. 89, n. 11, p. 1028-1037, 1999.
40. HASSEGAWA, R.H; ZORZETE, P; REIS, T.A; FANCELLI, A.L; FONSECA, H; ALMEIDA, A. P; CORREA, B. The nutrients effect on mycoflora, and for fumonisins and aflatoxins production in corn grain. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 65, n. 1, p. 21-26, 2006.
41. SHAHAROONA, B; NAVEED, M; ARSHAD, M; ZAHIR, Z. Fertilizer-dependent efficiency of *Pseudomonads* for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Applied Microbiology e Biotechnology**. v. 79, p. 147-155, 2008.
42. LARKIN, R. P; FRAVEL, D. Efficacy of Various Fungal and Bacterial Biocontrol Organisms for Control of *Fusarium* Wilt of Tomato. **Plant Disease**, v. 82, n. 9, p. 1022-1028, 1998.
43. AFZAL, A; BANO, A. *Rhizobium* and Phosphate Solubilizing Bacteria Improve the Yield and Phosphorus Uptake in Wheat (*Triticum aestivum*). **International Journal of Agriculture e Biology**. v. 10, n. 1, p.85-88, 2008.

44. 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, n. 4, p. 247-251, 1995.
45. SHELBY, R. A; WHITE, D. G; BAUSKE, E. M. Differential fumonisin production in maize hybrids. **Plant Disease**, 78, 582-584, 1994.
46. ONO, E. Y.S; BIAZON, L; DA SILVA, M; VIZONI, E; SUGIURA, Y.; UENO, Y; HIROOKA, E. Y. Fumonisin in corn: Correlation with *Fusarium* sp. count, damaged kernels, protein and lipid content. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 49, 63-71, 2006.

Tabela 1 – Descrição do tratamento utilizando a cultivar Mon 810, submetida a diferentes fontes de fosfato (SFT, GAFSA e ITAFÓS) com e sem a aplicação de *Pseudomonas fluorescens*.

Tratamentos	Fonte de Fosfato	Característica	<i>P. fluorescens</i>
1	TSA	-	SEM
2	TSA	-	COM
3	SFA	Solúvel	SEM
4	SFA	Solúvel	COM
5	GAFSA	Natural reativo	SEM
6	GAFSA	Natural reativo	COM
7	ITAFÓS	Natural não reativo	SEM
8	ITAFÓS	Natural não reativo	COM
9	SFT+GAFSA	Misto	SEM
10	SFT+GAFSA	Misto	COM
11	SFT+ITAFÓS	Misto	SEM
12	SFT+ITAFÓS	Misto	COM

TSA= Testemunha; SFT= Superfosfato triplo; GAFSA= Fosfato de Gafsa; ITAFÓS = Fosfato Itafós; SFT+GAFSA = Superfosfato triplo e Fosfato de Gafsa; SFT+ITAFÓS= Superfosfato triplo e Fosfato Itafós;

Tabela 2 – Frequência absoluta e relativa dos principais gêneros fúngicos nas amostras de milho (n=48), submetido a diferentes fontes de adubação fosfatada, com e sem aplicação de *Pseudomonas fluorescens*, da Região Norte do Paraná.

Gêneros fúngicos	Safras	
	2010 (n = 48)	
	FA	FR
<i>Fusarium</i> spp.	37	77
<i>Penicillium</i> spp.	36	75
<i>Aspergillus</i> spp.	ND	ND

FA = Frequência absoluta; FR = Frequência relativa (%); ND= Não detectado

Tabela 3 – Contagem de bolores e leveduras, *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. em amostras de milho submetidas aos tratamentos com adubação fosfatada (TSA, SFT, GAFSA, ITAFÓS, SFT + GAFTA, SFT + ITAFÓS), com e sem aplicação de *Pseudomonas fluorescens*, da Região Norte do Paraná.

Tratamentos	N	<i>Fusarium</i> spp. (UFC/g)			<i>Penicillium</i> spp. (UFC/g)			Contagem total de bolores e leveduras (UFC/g)	
		Amostras positivas (%)	Média	Varição	Amostras positivas (%)	Média	Varição	Média	Varição
TSA – sem	4	100	$3,4 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3 - 1,1 \times 10^5$	75	$3,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3 - 6,5 \times 10^2$	$3,4 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3 - 1,1 \times 10^5$
TSA – com	4	50	$2,6 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4 - 3,1 \times 10^4$	50	$3,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2 - 6,5 \times 10^2$	$1,2 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2 - 3,1 \times 10^4$
SFT – sem	4	100	$3,4 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3 - 9,0 \times 10^3$	75	$2,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2 - 3,0 \times 10^2$	$3,9 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3 - 1,0 \times 10^4$
SFT – com	4	75	$2,5 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3 - 5,5 \times 10^3$	100	$1,4 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2 - 2,0 \times 10^2$	$2,5 \times 10^3$	$2,5 \times 10^2 - 7,4 \times 10^3$
GAFSA – sem	4	100	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3 - 1,1 \times 10^3$	50	$1,3 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2 - 1,5 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3 - 1,2 \times 10^3$
GAFSA – com	4	100	$6,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3 - 1,4 \times 10^5$	75	$4,6 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2 - 1,2 \times 10^4$	$8,2 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3 - 2,6 \times 10^4$
ITAFÓS – sem	4	75	$7,3 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3 - 2,0 \times 10^4$	75	$7,6 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2 - 2,2 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2 - 4,2 \times 10^4$
ITAFÓS – com	4	75	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3 - 1,0 \times 10^3$	100	$8,3 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2 - 2,3 \times 10^3$	$3,9 \times 10^3$	$8,5 \times 10^2 - 1,1 \times 10^4$
SFT/GAFSA – sem	4	50	$5,3 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3 - 9,0 \times 10^3$	100	$1,5 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2 - 2,0 \times 10^2$	$2,7 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2 - 9,2 \times 10^3$
SFT/GAFSA – com	4	100	$1,3 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3 - 2,0 \times 10^3$	75	$1,4 \times 10^3$	$2,5 \times 10^2 - 3,5 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2 - 5,5 \times 10^3$
SFT/ITAFÓS – sem	4	75	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3 - 2,6 \times 10^4$	50	$4,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2 - 5,0 \times 10^2$	$1,2 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3 - 2,6 \times 10^4$
SFT/ ITAFÓS – com	4	25	$2,5 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	75	$6,9 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2 - 1,9 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$2,0 \times 10^2 - 2,7 \times 10^4$

TSA= Testemunha; SFT= Superfosfato triplo; GAFSA= Fosfato de Gafsa; ITAFÓS = Fosfato Itafós; SFT+GAFSA = Superfosfato triplo e Fosfato de Gafsa; SFT+ITAFÓS= Superfosfato triplo e Fosfato Itafós; N= número de amostra; ND= Não detectado.

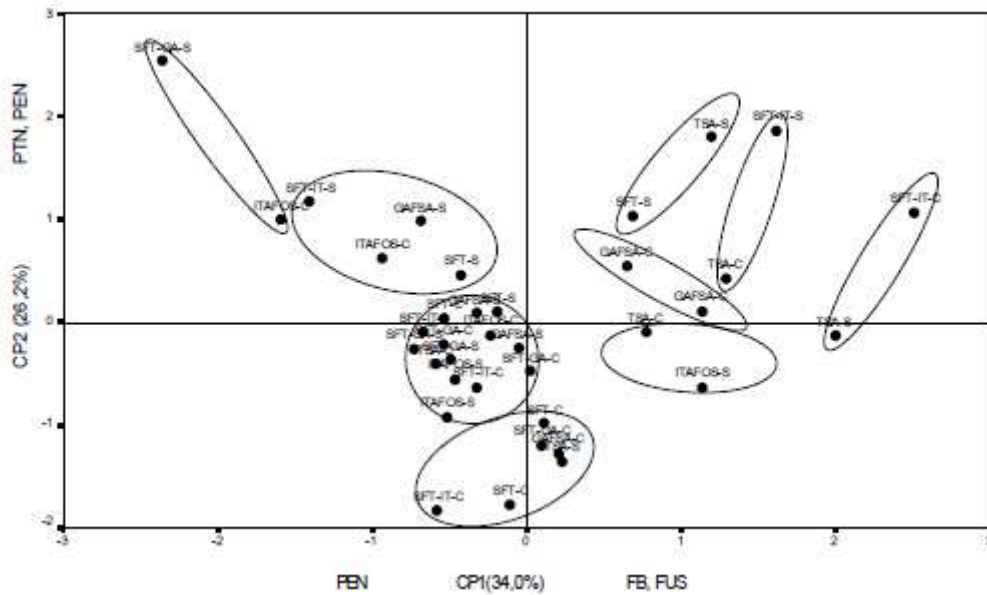
Tabela 4 – Níveis de contaminação de FB1, FB2 e FB Total, atividade de água e análise de proteínas de diferentes tratamentos de adubação fosfatada em milho (TSA, SFT, GAFSA, ITAFÓS, SFT + GAFTA, SFT + ITAFÓS, com e sem aplicação de *Pseudomonas fluorescens*), da Região Norte do Paraná.

Tratamento	N	Amostras positivas (%)	FB ₁ (µg/g)		Amostras positivas (%)	FB ₂ (µg/g)		FB Total (µg/g)		Atividade de água		Proteínas	
			Média	Variação		Média	Variação	Média	Variação	Média	Variação	Média (%)	Variação (%)
TSA – Sem	4	75	0,43	0,27 – 0,78	75	0,36	0,15 – 0,67	1,07	0,43 – 1,42	0,78	0,74 – 0,80	8,29	7,10 – 9,68
TSA – Com	4	25	0,22	0,22	ND	ND	ND	0,22	0,22	0,81	0,80 – 0,85	8,73	8,52 – 9,12
SFT – Sem	4	75	0,24	0,03 – 0,82	50	0,13	0,10 – 0,15	0,41	0,03 – 0,98	0,77	0,73 – 0,80	8,97	8,23 – 9,25
SFT – Com	4	100	0,09	0,03 – 0,24	25	0,17	0,17	0,17	0,03 – 0,42	0,81	0,79 – 0,81	8,21	7,25 – 8,88
GAFSA – Sem	4	25	0,32	0,32	25	0,18	0,18	0,50	0,50	0,80	0,77 – 0,83	8,83	8,37 – 9,65
GAFSA - Com	4	75	0,38	0,36 – 0,62	75	0,32	0,07-0,51	0,83	0,40 – 1,05	0,81	0,79 – 0,82	8,04	7,60 – 8,54
ITAFÓS – Sem	4	50	0,08	0,06 – 0,20	25	0,09	0,09	0,18	0,06 – 0,29	0,81	0,78 – 0,83	8,39	7,85 – 9,33
ITAFÓS – Com	4	50	0,15	0,08 – 0,23	ND	ND	ND	0,15	0,08 – 0,23	0,81	0,79 – 0,82	8,71	8,54 – 9,03
SFT – GAFSA – Sem	4	50	0,07	0,05 – 0,27	25	0,18	0,18	0,26	0,05 – 0,46	0,81	0,79 – 0,82	8,62	7,69 – 9,89
SFT – GAFSA – Com	4	25	0,08	0,08	ND	ND	ND	0,08	0,08	0,78	0,70 – 0,82	8,93	8,44 – 9,63
SFT – ITAFÓS – Sem	4	25	0,72	0,72	25	0,39	0,39	1,12	1,12	0,76	0,75 – 0,79	8,21	7,10 – 8,71
SFT – ITAFÓS - Com	4	25	0,33	0,33	25	0,19	0,19	0,52	0,52	0,79	0,74 – 0,81	9,26	8,73 – 9,74

Limite de detecção: FB1 0,0275 µg.g⁻¹; FB2 0,0353 µg.g⁻¹

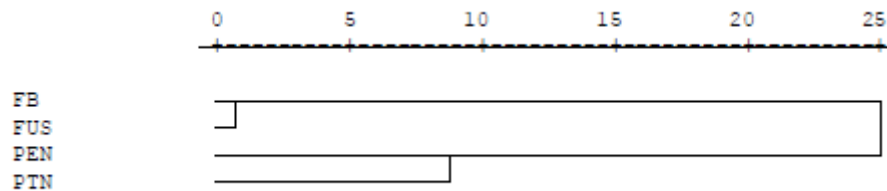
TSA= Testemunha; SFT= Superfosfato triplo; GAFSA= Fosfato de Gafsa; ITAFÓS = Fosfato Itafós; SFT+GAFSA = Superfosfato triplo e Fosfato de Gafsa; SFT+ITAFÓS= Superfosfato triplo e Fosfato Itafós; n= número de amostra; ND= Não detectada.

Figura 1 – Dispersão das amostras nas componentes principais 1 e 2 em amostras de milho, submetidas à adubação fosfatada com e sem aplicação de inoculante (*P. fluorescens*), provenientes da região norte do Paraná, safra de 2010.



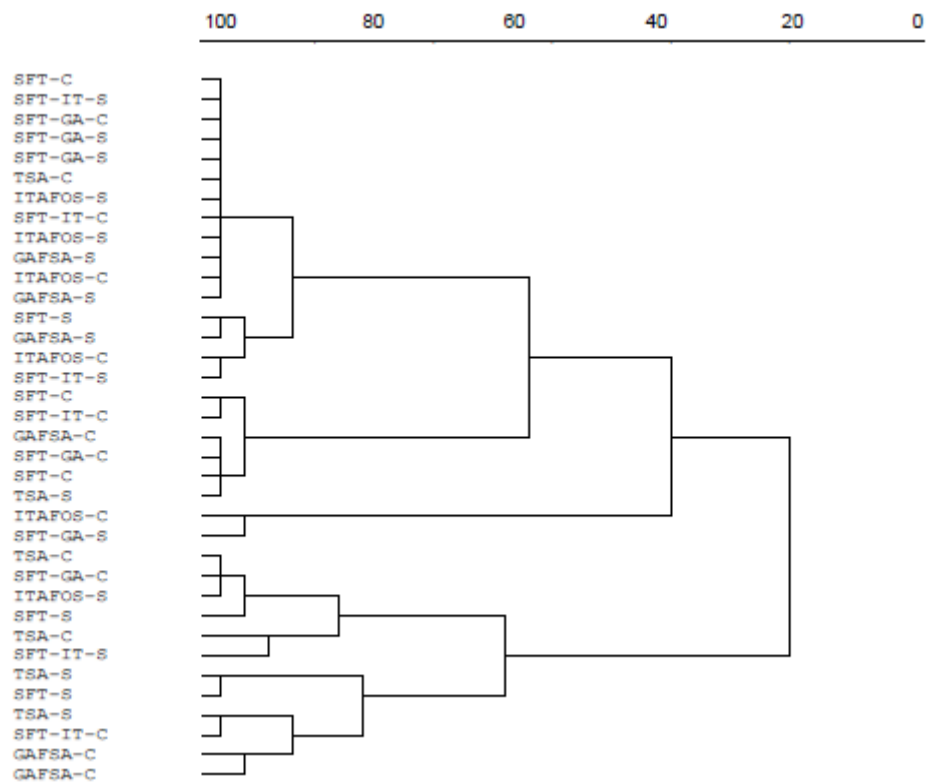
TSA= Testemunha; SFT= Superfosfato triplo; GAFSA= Fosfato de Gafsa; ITAFÓS = Fosfato Itafós; SFT+GAFSA = Superfosfato triplo e Fosfato de Gafsa; SFT+ITAFÓS= Superfosfato triplo e Fosfato de Itafós; C= Com inoculante; S= Sem inoculante.

Figura 2 – Similaridade entre as variáveis *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., fumonisinas (FB1 + FB2) e concentração de Proteínas detectadas nas amostras de milho submetidas à adubação fosfatada com e sem aplicação de inoculante (*P. fluorescens*), provenientes da região norte do Paraná, safra de 2010.



FUS= *Fusarium* spp.; PEN= *Penicillium* spp.; PTN= Concentração de proteína; FB= fumonisina (B1 + B2).

Figura 3 – Similaridade entre as amostras de milho submetidas à adubação fosfatada com e sem aplicação de inoculante (*P. fluorescens*), provenientes da região norte do Paraná, safra de 2010.



TSA= Testemunha; SFT= Superfosfato triplo; GAFSA= Fosfato de Gafsa; ITAFÓS = Fosfato Itafôs; SFT+GAFSA = Superfosfato triplo e Fosfato de Gafsa; SFT+ITAFÓS= Superfosfato triplo e Fosfato de Itafôs; C= Com inoculante; S= Sem inoculante.

REMOÇÃO DE DESOXINIVALENOL *IN VITRO* PELA MISTURA DE SORVENTES ORGÂNICO E INORGÂNICO

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de remoção de desoxinivalenol (DON) *in vitro* pela mistura de sorventes orgânico (β -glucana) e inorgânico (carvão ativado). O experimento foi realizado por meio de um planejamento fatorial incompleto 2^4 , com três repetições no ponto central, totalizando 11 parcelas. As variáveis independentes foram o pH (3,0, 5,0 e 7,0), a concentração de sorvente (0,2, 1,1 e 2 %), a concentração de DON (2500, 5000 e 7500 ng/mL) e a proporção dos sorventes carvão ativado e β -glucana (0:100, 30:70 e 15:85), avaliados nos tempos de incubação de 30, 60 e 90 minutos. A maior porcentagem de sorção ocorreu com a utilização de 2 % de carvão ativado e β -glucana na proporção 70:30 ($> 95,6$ %), nos tempos de incubação de 30, 60 e 90 minutos. As menores capacidades de sorção foram detectadas utilizando 0,2 % de carvão ativado e β -glucana na proporção 0:100 (de 14,4 % a 77,3 %). Os valores de pHs (3,0, 5,0 e 7,0) não apresentaram influência no processo de sorção de DON *in vitro*. O modelo preditivo de otimização integrado das variáveis independentes do processo da sorção de DON *in vitro*, descreve nos tempos de incubação entre o sorvente e DON (30, 60 e 90 min.), que a sorção será máxima (100 %) quando fixadas as variáveis pH, concentração da toxina e porcentagem de sorvente no nível codificado +1 (pH 7,0, 7500 ng/mL e 2 %, respectivamente) e a variável proporção de carvão ativado e β -glucana no nível codificado -1 (30:70). A fiabilidade dos resultados foram confirmados por meio da análise de variância (Teste t), demonstrando que a equação do modelo do planejamento obtido pode ser aplicado para a predição da porcentagem de sorção de DON *in vitro*, quando utilizadas as mesmas condições experimentais. A mistura dos dois sorventes (carvão ativado e β -glucana) na concentração de 2 % foi eficaz na faixa de pH entre 3,0 e 7,0, cobrindo a faixa encontrada no trato gastrointestinal de animais ruminantes e monogástricos, demonstrando seu potencial para minimizar o risco de contaminação por DON.

Palavras-chave: Detoxificação. Micotoxinas. Sorção, β -glucana. Carvão ativado.

INTRODUÇÃO

O Desoxinivalenol (DON), um tricoteceno do tipo B, é uma micotoxina produzida por *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. tricinctum* e *F. acuminatum* (DESJARDINS et al., 1993; KOKKONEN et al., 2010). DON pode causar sérios problemas relacionados à saúde, como problemas gastrintestinais (náuseas, vômitos e diarreia), imunossupressão, hemorragia e redução do consumo de alimentos em animais (ROTTER et al., 1996; HSU et al., 1972; LEATHWOOD, 1987; TRENHOLM et al., 1989, BINDER, 2007).

[Inserir Figura 1]

A contaminação por DON é detectada em culturas utilizadas para produção de alimentos para seres humanos e animais no mundo todo (HAFNER et al., 2007; PESTKA; SMOLINSKI, 2005; PLACINTA et al., 1999; ROTTER et al., 1996). No Brasil, a contaminação em trigo e milho é relatada por vários autores, principalmente na região sul, devido às menores temperaturas que favorecem o crescimento do fungo toxigênico (CALORI-DOMINGUES et al., 2007; MILANEZ; VALENTE-SOARES, 2006; OLIVEIRA et al., 2002). Calori-Domingues et al. (2007), avaliando 100 amostras de trigo (50 amostras dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul e 50 amostras da Argentina e Paraguai) coletadas no ano de 2005, detectaram a contaminação por DON em 94 % das amostras de trigo nacional (média 332 µg/Kg) e 88 % do trigo importado (90 µg/Kg). Em 4 % das amostras de trigo nacional essa contaminação foi superior ao limite máximo permitido pela Comunidade Européia (1.250 µg/kg). Em São Paulo, Milanez e Valente-Soares (2006) detectaram a contaminação por DON (média 71 µg/Kg) e nivalenol (média 106 µg/Kg) em 6 % das amostras de milho analisadas (n=80).

Devido aos riscos relacionados à saúde humana e animal, bem como às perdas econômicas pela presença de DON em alimentos, torna-se necessário minimizar a contaminação por essa micotoxina (LEIBETSEDER, 2009). Várias estratégias têm sido aplicadas na detoxificação de micotoxinas em grãos e alimentos processados, como métodos biológicos, químicos e físicos (BATA; LÁSZTITY, 1999; SWEENEY; DOBSON, 1998; RUSTOM, 1996), porém muitos desses métodos têm sido empregados com sucesso limitado. Uma das alternativas promissoras é a utilização de materiais sorventes (MALLMANN et al., 2006; AWAD et al., 2010).

Os sorventes atuam como seqüestradores, formando ligações com as moléculas de micotoxinas no trato gastrintestinal e reduzem o grau de absorção da micotoxina pelo intestino, diminuindo desta forma, a toxicidade sistêmica no organismo humano e animal (SEKIYAMA et al., 2007; HUWIG et al., 2001; YIANNILOURIS et al., 2006).

Entre os sorventes utilizados para DON estão o carvão ativado e a parede celular de levedura ou partes da sua constituição, como a β -glucana (AVANTAGGIATO et al., 2004; YIANNILOURIS et al., 2005). Diversos pesquisadores relataram a alta eficácia de carvão ativado (> 95 %) na sorção de DON, diferentemente da utilização de componentes de parede celular de leveduras, como a β -glucana, que demonstraram menores valores de sorção (< 80 %) (CAVRET et al., 2010; AVANTAGGIATO et al., 2004; AVANTAGGIATO et al., 2005).

Apesar da alta eficiência do carvão ativado como sorvente, existem algumas desvantagens em relação à sua utilização, como a formação da poeira e coloração escura que podem interferir na aparência do alimento (SABATER-VILAR et al., 2007). Este problema pode ser minimizado por meio da mistura de carvão ativado com β -glucana de levedura, que além de atuar como sorvente, pode exercer efeitos benéficos sobre o sistema imunológico do animal, estimulando a atividade antitumoral e antimicrobiana do organismo (BROWN; GORDON, 2001).

Considerando os efeitos benéficos do carvão ativado e β -glucana como adsorventes e que na maioria dos estudos com sorventes são analisados os efeitos das variáveis experimentais separadamente, o presente estudo visou realizar a otimização da remoção de DON por meio da mistura de sorventes orgânico (β -glucana) e inorgânico (carvão ativado) a partir de planejamentos estatísticos, para analisar os efeitos em conjunto das variáveis experimentais na sorção dessa toxina.

MATERIAL E MÉTODOS

Padrões e Reagentes: Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, exceto metanol (grau HPLC). Os sorventes para micotoxinas, composto de uma mistura na proporção de 0:100, 15:85 e 30:70 de carvão ativado e β -glucana, respectivamente, foram cedidos pela SLO Agropecuária e Biotecnologia Ltda.

O padrão de DON foi adquirido da Acros Organics®, com pureza de 99,9 %. Soluções-padrão estoque foram preparadas em metanol e mantidas a - 20°C. Os padrões foram quantificados pela determinação da absorvância de DON em 260 nm utilizando espectrofotômetro UV-VIS, segundo a metodologia do Instituto Adolfo Lutz, (1998).

Delineamento Experimental para os Testes de Sorção: Para otimização da sorção de DON, foi realizado um conjunto de experimentos seguindo um planejamento experimental 2^4 incompleto, contendo três pontos centrais, onde foram avaliadas as variáveis pH (3,0, 5,0 e 7,0), concentração de DON (2500, 5000 e 7500 ng/mL), quantidade de sorvente (0,2, 1,1 e 2 %), e proporção dos sorventes carvão ativado e β -glucana (30:70, 15:85 e 0:100), nos tempos de incubação entre DON e o sorvente de 30, 60 e 90 minutos, conforme apresentado na Tabela 1.

Ensaio de Sorção de DON *in vitro*: Aliquotas de sorvente em pó (10, 55 e 100 mg) correspondentes a 0,2, 1,1 e 2 % (m/v) foram adicionadas a tubos Falcon de 50 mL contendo 4,5 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L (pH 3,0, 5,0 e 7,0) e 0,5 mL de padrão de desoxinivalenol em metanol, nas concentrações de 2500, 5000 e 7500 ng/mL. Os tubos foram agitados a 250 r.p.m. por 30, 60 e 90 minutos e centrifugados a 4000 x g, por 10 minutos a 25 °C. Controles (sem sorvente) foram preparados simultaneamente e DON foi analisado no sobrenadante.

Extração de DON: A uma aliquota de 4 mL do sobrenadante dos testes de sorção foram adicionados 0,1g de cloreto de sódio (NaCl), seguido por homogeneização em shaker por 30 minutos a 180 r.p.m. e filtração em lã de vidro. Uma aliquota de 2 mL deste filtrado foi retirado, adicionado a 2 mL de água ultra-pura, homogeneizado e aplicado na coluna *DONtest* (VICAM, EUA). Para a eluição de DON foram adicionados 2 mL de metanol grau HPLC, o eluato foi seco sob fluxo de gás N₂ a 45°C, o resíduo dissolvido em 400 uL de metanol 30 %, e aliquoteado em amostras de 100 uL, procedendo-se ao acondicionamento em freezer (-20 °C) para posterior análise.

Determinação de DON: A alíquota de 100 uL foi redissolvida em 100 uL metanol 30 % e analisada por Cromatografia líquida de Alta Eficiência - CLAE (Shimadzu), com sistema isocrático de fase reversa, bomba de LC-10AD, detector SPD-10A UV/VIS a 220 nm, utilizando a coluna nucleosil 100 C 18, 5 um (250 x 4 mm; Merck). A fase móvel consistiu de metanol 30 %, em um fluxo de 0,7 mL/min.

Análise Estatística: Foi aplicada análise de variância ANOVA ao nível de 95 % de confiança no planejamento estatístico 2⁴ incompleto e metodologia de superfície de resposta (MSR), e para validação da equação obtida no modelo estatístico utilizado, foi aplicado o Teste t de Student por meio do software Statistica 7.0 (Stat Soft, Inc.).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variáveis independentes codificadas e decodificadas (pH, concentração de DON, percentagem e proporção dos sorventes carvão ativado e β-glucana) e a percentagem de sorção de DON, nos tempos de incubação de 30, 60 e 90 minutos *in vitro*, estão apresentados na Tabela 1.

[Inserir Tabela 1]

O modelo de planejamento obtido apresentou coeficientes de correlação (R) satisfatórios de 0,99, 0,84 e 0,72 em 30, 60 e 90 min, respectivamente. A mistura de carvão ativado e β -glucana na proporção de 30:70 apresentou elevada eficiência na sorção de DON *in vitro* (> 86,9 %) nos tempos de incubação de 30 e 60 minutos, entretanto, em 90 minutos a percentagem de sorção diminuiu para 14,7 %, utilizando 0,2 % de carvão ativado e β -glucana, 2500 ng/mL de DON e pH 3,0. Em relação à aplicação da proporção 15:85 de carvão ativado e β -glucana, em 30 minutos houve a sorção de 73,9 a 76,9 %, porém nos tempos de 60 e 90 minutos de incubação, a sorção foi maior que 91 % em todos os testes. No teste utilizando a proporção 0:100 de carvão ativado e β -glucana, ocorreu menor sorção, variando de 35,8 a 70,3 % nos testes realizados em 30 minutos, enquanto que em 90 minutos variaram entre 14,4 a 68,9 %. Os resultados obtidos neste experimento são similares aos obtidos por Sabater-Vilar et al. (2007), Cavret et al. (2010), Galvano et al. (1998) e Avantaggiato et al. (2004). Em testes de sorção *in vitro*, utilizando as concentrações de 0,1, 0,25 e 0,5 % de sorvente e 1000 ng/mL de DON, Sabater-Vilar et al. (2007) demonstraram a sorção de 93 % em carvão ativado, enquanto que a β -glucana apresentou 16 %. Cavret et al. (2010) detectaram a sorção de DON (1 μ M) por carvão ativado (99,9 %), mananas de *S. cerevisiae* (84,6 %), β -glucana de algas (81,1 %) e β -glucana de fungos (80,0 %). Galvano et al. (1998) aplicando 2 % de carvão ativado em 4000 ng/mL de DON, relataram a sorção de 98,9 % da toxina, enquanto Avantaggiato et al. (2004) a sorção de 90 %, utilizando 0,1 % de carvão ativado em 2000 ng/mL de DON.

A variação do pH (3,0, 5,0 e 7,0) não apresentou interferência no processo de sorção de DON *in vitro*. Quando utilizado 2 % de carvão ativado e β -glucana na proporção 30:70, em pH 3,0 a sorção foi de 95,6 % (90 min) e em pH 7,0, 100 % de sorção de DON, nos tempos de 30, 60 e 90 minutos. Esses resultados corroboram com Sherata et al. (2000) que aplicaram 2,5 % de carvão ativado na sorção de 30 ng/g de DON *in vitro* e relataram a sorção de 98,7 %, em pH 3,0 e 7,0.

A eficiência da mistura dos sorventes carvão ativado e β -glucana na proporção de 30:70 na sorção de DON, pode estar relacionada à alta afinidade do carvão ativado pela molécula de DON. Avantaggiato et al. (2004) e Avantaggiato et al. (2006) sugerem que a molécula de DON liga-se ao carvão ativado por interações hidrofóbicas, num mecanismo de saturação, em que o pH pode ser um fator limitante desta interação, uma vez que a sorção diminui em meios mais ácidos. Galvano et al. (1998) relataram que alguns tipos

de carvão ativado possuem a capacidade de adsorver até 2 ug de DON por mg de carvão ativado. Por outro lado, foi demonstrado que as moléculas de β -glucana ligam-se à molécula de DON por meio de ligações de hidrogênio (YANNIKOURIS et al., 2006). Yannikouris et al. (2004) relataram que as ligações formadas entre a molécula de β -glucana e a toxina são estáveis quando submetidas às variações de pH encontradas ao longo do trato digestivo. Assim, a combinação de carvão ativado e β -glucana neste trabalho foi mais eficaz para a remoção de DON *in vitro* na ampla faixa de pH analisada (3,0 a 7,0), quando comparado com a aplicação de β -glucana individualmente.

Na Figura 1 é apresentada a região de combinação binária entre as variáveis independentes concentração da toxina (X_2) e proporção de carvão ativado e β -glucana 30:70 (X_4) em porcentagem, obtidas pelos modelos matemáticos apresentados para o tempo de 30, 60 e 90 minutos, respectivamente, propondo-se em todos os casos, as variáveis X_1 e X_3 no nível codificado 0 (zero) (pH 5,0, 1,1 % de sorvente). A superfície de resposta demonstrou que quando aplicada a proporção de 30:70 de carvão ativado e β -glucana, houve a tendência de aumento de sorção de DON, independente da concentração da toxina (entre 2500 e 7500 ng/mL), do tempo (30, 60 e 90 min.) e do pH (3,0, 5,0 e 7,0) analisados.

Nas equações 1, 2 e 3 estão apresentadas as variáveis do modelo de planejamento utilizado, nos tempos de incubação de 30, 60 e 90 minutos, onde as variáveis X_1 , X_2 , X_3 e X_4 representam o pH, a concentração da toxina, a porcentagem do sorvente e a proporção entre carvão ativado e β -glucana, respectivamente. O modelo preditivo de otimização integrado das variáveis independentes do processo de sorção de DON *in vitro*, descreve nos três tempos de incubação entre o sorvente e DON (30, 60 e 90 min.), que a sorção será máxima (100 %) quando fixadas as variáveis pH, concentração da toxina e porcentagem de sorvente no nível codificado +1 (pH 7,0, 7500 ng/mL e 2 %, respectivamente) e a variável proporção de carvão ativado e β -glucana no nível codificado -1 (30:70).

$$y_{30\text{min}} = 75,89 - 4,35X_1 + 16,40 X_2 + 2,90 X_3 - 40,55 X_4 - 4,75 X_1.X_2 + 19,95 X_1.X_3 - 0,80 X_1.X_4$$

Equação 1: Variáveis do modelo estatístico 2^4 incompleto, no tempo de incubação de 30 minutos.

$$y_{60\text{min}} = 75,90 + 1,20X_1 + 13,40 X_2 - 3,50 X_3 - 47,50 X_4 - 13,65 X_1.X_2 + 12,55 X_1.X_3 - 1,75 X_1.X_4$$

Equação 2: Variáveis do modelo estatístico 2^4 incompleto, no tempo de incubação de 60 minutos.

$$y_{90\text{min}} = 64,91 + 4,71 X_1 + 29,76 X_2 + 12,26 X_3 - 43,88 X_4 - 31,93 X_1.X_2 - 6,93 X_1.X_3 - 36,38 X_1.X_4$$

Equação 3: Variáveis do modelo estatístico 2^4 incompleto, no tempo de incubação de 90 minutos.

[Inserir Figura 2]

A fiabilidade de cada uma das superfícies de resposta foi confirmada por meio da análise de variância (Teste t). Em cada tempo de teste de sorção (30, 60 e 90 min.), foram realizados três experimentos para validação experimental da resposta obtida, de acordo com o modelo preditivo proposto pela equação, sendo os experimentos iguais para os três tempos de incubação testados. Os resultados estão demonstrados na Tabela 2.

[Inserir Tabela 2]

Os resultados dos testes de sorção em triplicata nos tempos de 30, 60 e 90 minutos não foram significativos, demonstrando que o modelo do planejamento obtido por meio da metodologia de superfície de resposta pode ser aplicado para a predição da porcentagem de sorção de DON *in vitro*, quando aplicado sob as mesmas condições experimentais.

A mistura dos sorventes carvão ativado e β -glucana, na proporção de 30:70, respectivamente, e na porcentagem de 2 % foi eficaz na faixa de pH de 3 a 7, cobrindo a faixa de pH encontrada no trato gastrointestinal de animais ruminantes e monogástricos. Esses resultados sugerem o potencial da aplicação da mistura de carvão ativado e β -glucana em rações animais para minimização do risco de contaminação por DON.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPQ, CNPQ/MAPA, Fundação Araucária, PPSUS/Ministério da Saúde, Fundo Paraná/SETI, CAPES, Projeto Nanotecnologia (04/CII-2008) e SLO Agropecuária e Biotecnologia Ltda pelo apoio financeiro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOVIC, Biljana; JAJIC, Igor; JURIC, Verica; GAAL, Ferenc F. Optimization of the determination of deoxynivalenol in corn samples by liquid chromatography and a comparison of two clean-up principles. **Journal of the Serbian Chemical Society**. v. 70, p. 1005-1013, 2005.

ADOLFO, LUTZ I. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4. Ed. São Paulo, 1985.

AVANTAGGIATO, G; HAVENAARB, R; VISCONTIA, A. Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an *in vitro* gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.817-824, 2004.

AVANTAGGIATO, G; SOLFRIZZO, M; VISCONTI, A. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 4, 379-388, 2005.

AWAD, Wa; GHAREEB, K, BOHM, J., ZENTEK, J. Decontamination and detoxification strategies for the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation. **Food additives and contaminants**, v. 4, n. 27, p. 510-520, 2010.

BATA, A.; LASZTITY, R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. **Trends in Food Science and Technology**, v.10, p.223-228, 1999.

BINDER, E.M; TAN, L.M; CHIN, L.J; HANDL, J; RICHARD, J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 265-282, 2007.

BROWN, G. D; GORDON, S. Immune recognition: A new receptor for P-glucans. **Nature**. v. 413, p. 36-37, 2001.

CAVRET, S; LAUREBT, N; VIDEMANN, B; MAZALLON, M; LECOEUR, S. Assessment of deoxynivalenol (DON) adsorbents and characterisation of their efficacy using complementary *in vitro* tests. **Food Additives e Contaminants: Part A**, v. 27, p. 43 - 53, 2010.

CALORI-DOMINGUES, M. A; ALMEIDA, R. R; TOMIWAKA, M. M; GALLO, C. R; GLORIA, E. M; DIAS, C. T. S. Ocorrência de desoxinivalenol em trigo nacional e importado utilizado no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 181-185, 2007.

DESJARDINS, A. E; HOHN, T. M; McCORMICK S. P. Trichothecene Biosynthesis in *Fusarium* Species: Chemistry, Genetics, and Significance. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 3, p.595-604, 1993.

HAFNER, M; KUBUS, Z; FREUDENSCHUSS, M; BINDER, E. M; KRŠKA, R. Rapid fluorometric test the quantitative determination of deoxynivalenol in raw cereals. **Mycotoxin Research**. v.23, p. 3-6, 2007.

GALVANO, F;PETRI, A; BERTUZZI, T; PIVA, A; CHIES, L; GALVANO, M. Activated carbons: In vitro affinity for ochratoxin A and deoxynivalenol and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. **International Association for Food Protection**. v. 61, n. 4, p. 469-475, 1998.

HSU I. C; SMALIEY E. B; STRONG F. M; RIBELIN W. E. Identification of T-2 toxin in oldy corn associated with a lethal toxicosis in dairy cattle. **Applied and Environmental Microbiology**. v, 24, p. 685-690, 1972.

HUWIG, A., FREIMUND, S., KAPPELI, O., DUTLER, H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters** 122, 179-188, 2001.

KOKKONEN, M; OJALA, L; PARIKKA, P; JESTOI, M. Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 17-25, 2010.

LEATHWOOD, D. Tryptophan availability and serotonin synthesis. **Proceedings of the Nutrition Society**. n. 46, p.143-156, 1987.

LEIBETSEDER, J. Decontamination and detoxification of mycotoxins. **Biology of Nutrition in Growing Animals**. v. 4, p. 439-465, 2006MILANEZ, T. V; VALENTE-SOARES, L. M. Gas Chromatography - Mass Spectrometry Determination of Trichothecene Mycotoxins in Commercial Corn Harvested in the State of São Paulo, Brazil. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 17, n. 2, p. 412-416, 2009.

MALLMANN, C. A; DILKIN, P; GIACOMINI, L. Z; RAUBER, R. H. Critérios para Seleção de um Bom Sequestrante para Micotoxinas. In: Conferência APINCO. Santos: **FACTA** - Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia, p. 213-224, 2006.

MILANEZ, T. V; VALENTE-SOARES, L. M. Gas Chromatography - Mass Spectrometry Determination of Trichothecene Mycotoxins in Commercial Corn Harvested in the State of São Paulo, Brazil. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 17, n. 2, p. 412-416, 2006.

OLIVEIRA, M. S; PRADO, G; ABRANTES, F. M; SANTOS, L. G; VELOSO, T. Incidência de Aflatoxinas, Desoxinivalenol e Zearalenona em produtos comercializados em cidades do estado de Minas Gerais no período de 1998 - 2000. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 61, p. 1-6, 2002.

PESTKA, J. J; SMOLINSKI, A. T. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Part B, v.8, p. 39-69, 2005.

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.

ROTTER, B. A; PRELUSKY, D. B; PESTKA, J. J. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). **Journal of Toxicology and Environmental Health**. v. 48, n. 1, p. 1-34,1996.

RUSTOM, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, v. 59, n. 1, 57-67, 1996.

SABATER-VILAR, M; MALEKINEJAD, H; SELMAN, M.H.J; DOELEN, M.A.M; FINK-GREMMELS, J. *In vitro* assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxins. **Mycopathologia**. V.163, p. 81-90, 2007.

SHEHATA, I. S; RICHTER, W. I. F; SCHUSTER, M; SCHOLZ W; NOWAR, M. S. Adsorption of Ochratoxin A, Deoxynivalenol Zearalenone *in vitro* at different pH and adsorbents. **Mycotoxin Research**, v. 16, p. 136- 140, 1985.

TRENHOLM, H. L; FRIEND, D.W; HAMILTON, R. M. G; PRELUSKY, D. B; FOSTER, B. C.. Lethal toxicity and nonspecific effects. In: Beasley, V.R. (Ed.), *Trichothecene Mycotoxicosis Pathophysiologic Effects*, Vol. I, p. 107-141, 1989.

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

YIANNIKOURIS, A; ANDRE, G; BULEON, A; JEMINET, G; CANET, I; FRANCOIS, J; BERTIN, G; JOUANY, J. P. 2004. Comprehensive Conformational Study of Key Interactions Involved in Zearalenone Complexation with β -D-Glucans. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 2176-2185, 2004.

YIANNIKOURIS, A; ANDRE, G; POUGHON, L; FRANCOIS, J; DUSSAP, C.G; JEMINET, G; BERTIN, G; JOUANY, J. P. Chemical and Conformational Study of the Interactions Involved in Mycotoxin Complexation with β -D-Glucans. **Biomacromolecules**, v.7, p.1147-1155, 2006.

Tabela 1 – Sorção de DON (%) para os diversos níveis do planejamento estatístico fatorial 24 contendo três pontos centrais, com variáveis codificadas e decodificadas (pH, concentração de DON, percentagem e proporção dos sorventes carvão ativado e β -glucana), nos tempos de incubação de 30, 60 e 90 minutos *in vitro*.

Ensaio	Variáveis Codificadas				Variáveis Decodificadas				Sorção de DON (%)		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	pH	DON (ng/mL)	Sorvente (%)	Proporção CA/ β G	30 min	60 min	90 min
1	-1	-1	-1	-1	3,0	2500	0,2	30:70	95,9	86,9	14,7
2	1	-1	-1	1	7,0	2500	0,2	0:100	35,8	41,7	14,4
3	-1	1	-1	1	3,0	7500	0,2	0:100	77,3	68,2	68,9
4	1	1	-1	-1	7,0	7500	0,2	30:70	88,8	90,7	92,5
5	-1	-1	1	1	3,0	2500	2,0	0:100	39,1	25,1	26,4
6	1	-1	1	-1	7,0	2500	2,0	30:70	100,0	100,0	100,0
7	-1	1	1	-1	3,0	7500	2,0	30:70	100,0	97,9	95,6
8	1	1	1	1	7,0	7500	2,0	0:100	70,3	50,5	17,5
9	0	0	0	0	5,0	5000	1,1	15:85	76,9	91,2	94,9
10	0	0	0	0	5,0	5000	1,1	15:85	76,8	91,1	94,5
11	0	0	0	0	5,0	5000	1,1	15:85	73,9	91,6	94,6

Tabela 2 – Valores das variáveis otimizadas, previstas pelas equações 1, 2 e 3 na sorção de DON *in vitro*, nos tempos de incubação de 30, 60 e 90 min.

Tempo (min)	Sorção (%)			Média	Desvio Padrão	Valor p
	1	2	3			
30	94,7	92,7	87,7	91,70	3,60	0,057
60	93,8	87,1	94,4	91,76	4,05	0,072
90	100	100	94,7	98,23	3,05	0,422

Figura 1 – Estrutura química de Desoxinivalenol (ABRAMOVIC et al., 2005).

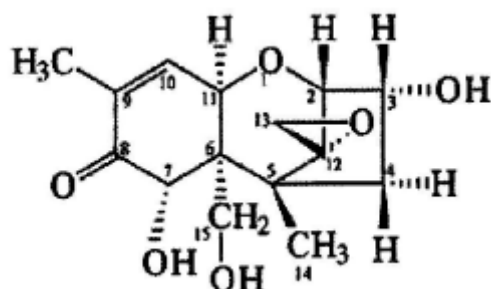
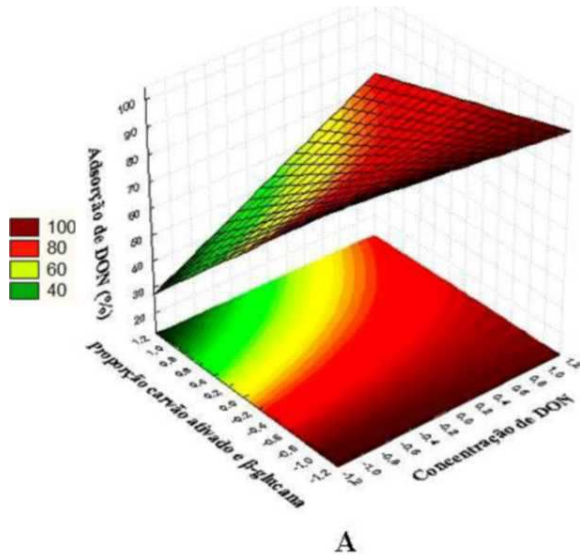
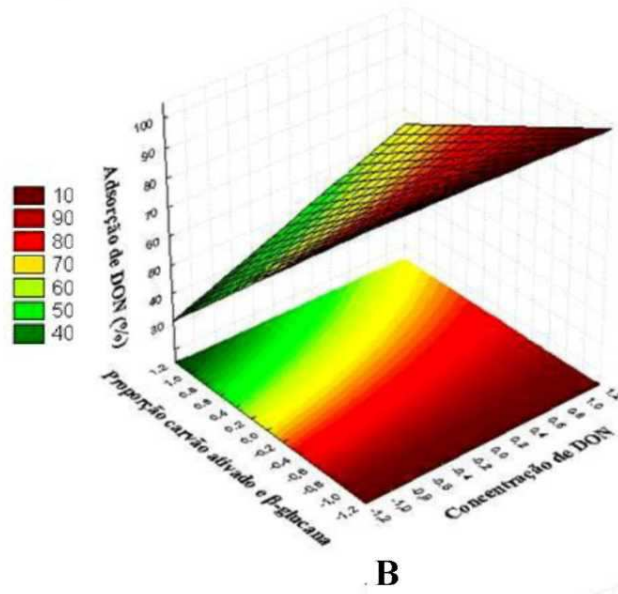


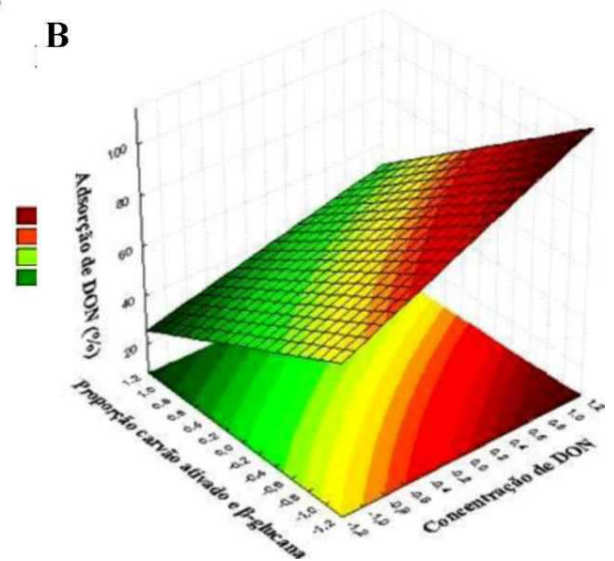
Figura 2 – Superfície de resposta do planejamento estatístico fatorial 24 contendo três pontos centrais demonstrando a combinação binária entre as variáveis proporção de carvão ativado e β -glucana e concentração da toxina, no teste de sorção de DON *in vitro*, nos tempos de 30 (A), 60 (B) e 90 (C) min.



A



B



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As diferentes cultivares de milho (Asteca, Caiano DKB 390 e IPR 114), submetidos à adubação orgânica e mineral (safra 2009 e 2010), apresentaram contaminação por *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. em 83 % e 100 % das amostras na safra 2009 e em 100 % e 69 % das amostras na safra 2010, respectivamente. *Aspergillus* spp. foi detectado somente na safra 2009 (14,5 %). As cultivares crioulas (Asteca e Caiano) mostraram-se mais suscetíveis à contaminação por *Fusarium* spp. em relação à cultivar DKB 390. A contaminação por fumonisinas variou de 0,03 a 0,79 ug/g na safra de 2009, e de 0,33 ug/g a 9,37 ug/g na safra de 2010. A cultivar DKB 390, quando aplicada com adubação mineral (NPK), apresentou níveis mais baixos de fumonisinas, enquanto que o tratamento com adubação orgânica apresentou maior contaminação.

O milho submetido a diferentes fertilizações fosfatadas (Testemunha, Superfosfato triplo, Fosfato de Gafsa, Fosfato Itafós, Superfosfato triplo e Fosfato de Gafsa, Superfosfato triplo e Fosfato Itafós) com e sem a inoculação de *P. fluorescens*, apresentou contaminação de 77 % e 75 % das amostras por *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp., respectivamente. As menores contaminações por *Fusarium* spp. foram detectadas nos tratamentos com fertilizações fosfatadas de fontes naturais (Fosfato de Gafsa e Fosfato Itafós com $1,0 \times 10$ UFC/g). A média de contaminação por fumonisinas (FB₁ + FB₂) variou de 0,08 a 1,12 ug/g, sendo que a aplicação de *P. fluorescens* com a fonte de fosfato solúvel (Superfosfato triplo) proporcionou menor contaminação por fumonisinas em relação às fontes naturais e aos tratamentos sem o inoculante.

A mistura de sorventes β -glucana e carvão ativado na proporção 30:70 apresentou melhor capacidade de sorção (100 %) de desoxinivalenol *in vitro* quando aplicado pH 7,0, 7500 ng/mL de toxina e 2 % de sorvente, nos tempos de 30, 60 e 90 min de incubação. A validação do experimento indicou que as equações obtidas nesse planejamento estatístico podem ser utilizadas para sorção de DON, quando aplicadas nas mesmas condições experimentais.

Os resultados desse estudo demonstram que a contaminação de milho por micotoxinas no campo pode ser minimizada por meio de boas práticas agrícolas, como a escolha de cultivares tolerantes e aplicação de fertilizantes adequados. Quando a contaminação no campo é inevitável, práticas de descontaminação, como a utilização de sorventes, podem ser aplicadas a fim de minimizar os riscos à saúde humana e animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC - American Association of cereal chemists. **Approved methods of the American association of cereal chemists**. 8.ed. St. Paul: Minnesota, 1990.

ABRAMOVIC, Biljana; JAJIC, Igor; JURIC, Verica; GAAL, Ferenc F. Optimization of the determination of deoxynivalenol in corn samples by liquid chromatography and a comparison of two clean-up principles. **Journal of the Serbian Chemical Society**. v. 70, p. 1005-1013, 2005.

ADOLFO, LUTZ I. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4. Ed. São Paulo, 1985.

AFZAL, A; BANO, A. *Rhizobium* and Phosphate Solubilizing Bacteria Improve the Yield and Phosphorus Uptake in Wheat (*Triticum aestivum*). **International Journal of Agriculture e Biology**. v. 10, n. 1, p.85-88, 2008.

AKANDE, K.E; ABUBAKAR,M.M; ADEGBOLA, T.A; BOGORO, S.E. Nutritional and Health Implications of Mycotoxins in Animal Feeds: A Review. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 5, n.5, p. 398-403, 2006.

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 the production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 6, p. 1729-1733, 1990

ANVISA - AGENCIA NACIONAL DE IGILANCIA SANITÁRIA, **SIA - Sistema de Informações Sobre Agrotóxicos**. 2007. Disponível em: < http://www4.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm_pesquisa_agrotoxico.asp> Acesso em: 08 NOV. 2009.

ARGENTA, G; SANGOI, L; SILVA, P.R.F; RAMPAZZO, C; GRACIETTI, L.C.; STRIEDER, M.L.; FORSTHOFER, E.L.; SUHRE, E. Potencial de rendimento de grãos de milho em dois ambientes e cinco sistemas de produção. **Scientia Agraria**, v. 4, n. 1-2, p. 27-34, 2003.

ARINO, A; HERRERA, M; JUAN,T; ESTOPANAN, G; CARRAMINANA, J. J; ROTA, C; HERRERA, A. Influence of Agricultural Practices on the Contamination of Maize by Fumonisin Mycotoxins. **Journal of Food Protection**, v.. 72, n.. 4, 2009, p. 898-902, 2009.

ALAKONYA, A; MONDA, E. E; OWINO, P. O; AJANGA, S. Use of organic soil amendments in management of *Fusarium moniliforme*. **African Crop cience Conference Proceedings**. v. 6, p. 277-281, 2003.

ASAM, S; RYCHLIK, M. Studies on accuracy of trichothecene multitoxin analysis using stable isotope dilution assays. **Mycotoxin Research**, v. 23, n.. 4, p. 191-198, 2007.

AVANTAGGIATO, G; HAVENAARB, R; VISCONTIA, A. Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an *in vitro* gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.817-824, 2004.

AVANTAGGIATO, G; SOLFRIZZO, M; VISCONTI, A. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 4, 379-388, 2005.

AWAD, WA., GHAREEB, K, BOHM, J., ZENTEK, J. Decontamination and detoxification strategies for the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation. **Food additives and contaminants**, v. 4, n. 27, p. 510-520, 2010.

BACON, C.W.; NELSON, P.E. Fumonisin Production in Corn by Toxicogenic Strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 6, p. 514 - 521, 1994.

BATA, A.; LASZTITY, R. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. **Trends in Food Science and Technology**, v.10, p.223-228, 1999.

BHATTACHARY, K; RAHA, S. Deteriorative changes of maize, groundnut and soybean seeds by fungi in storage. **Mycopathologia**. v. 155, n. 3, p. 135-141, 2002.

BELTRAN, E; IBANEZ, M; SANCHO, J. V; HERNANDEZ, F. Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. **Rapid Communications In Mass Spectrometry**, v. 23, p. 1801-1809, 2009.

BENNETT, J.W; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 16, n.3, p. 497-516, 2003.

BENSASSI, F; GOLLI-BENNOUR, E. E; ABID-ESSEFI, S; BOUAZIZ, C; HAJLAOUI, M. R; BACHA, H. Pathway of deoxynivalenol-induced apoptosis in human colon carcinoma cells. **Toxicology**, v.264, p. 104-109, 2009.

BEZUIDENHOUT, S.C; GELDERBLOM, 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**, p.743-745, 1988.

BEWLEY, J.D; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. Ed. Plenum Press, New York, 445 p. 1994.

BIAGI, G. Dietary supplements for the reduction of Mycotoxin intestinal absorption in pigs. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 25, p. 539-546, 2009.

BINDER, E.M; TAN, L.M; CHIN, L.J; HANDL, J; RICHARD, J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 265-282, 2007.

BLANDINO, M; REYNERI, A; VANARA, F. Influence of Nitrogen Fertilization on Mycotoxin Contamination of Maize Kernels. **Crop Protection**, v. 27, p. 222 - 230, 2008.

BRASILEIRA DE EQUIPAMENTOS LTDA - BRASEQ. **Manual de instruções de operação**: analisador de atividade de água Aqualab - Decagon. [S. l.], 2005.

BROWN, G. D; GORDON, S. Immune recognition: A new receptor for β -glucans. **Nature**, v. 413, p. 36-37, 2001.

BUIATE, E. A. S; BRITO, C. H; BATISTELLA, R. A. B; BRANDÃO, A. M. **Reação de híbridos de milho e levantamento dos principais fungos associados ao complexo de patógenos causadores de "grão ardido" em Minas Gerais.** 2008. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/horizontecientifico/article/viewFile/4125/3072>> Acesso em: 17 jun. 2010.

BÜNZEN, S; HAESE, D. Controle de Micotoxinas na Alimentação de Aves e Suínos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.3, n.1, p.299-304, 2006.

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, n. 4, p. 247-251, 1995.

CALDAS, E. D; SILVA, A. C. S. Mycotoxins in Corn-Based Food Products Consumed in Brazil: An Exposure Assessment for Fumonisin. **Journal of Agricultural Applied and Environmental Microbiology Food Chemistry**, v. 55, n. 19, p. 7974-7980, 2007.

CALORI-DOMINGUES, M. A; ALMEIDA, R. R; TOMIWAKA, M. M; GALLO, C. R; GLORIA, E. M; DIAS, C. T. S. Ocorrência de desoxinivalenol em trigo nacional e importado utilizado no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 181-185, 2007.

CAVRET, S; LAUREBT, N; VIDEMANN, B; MAZALLON, M; LECOEUR, S. Assessment of deoxynivalenol (DON) adsorbents and characterisation of their efficacy using complementary *in vitro* tests. **Food Additives e Contaminants: Part A**, v. 27, p. 43 - 53, 2010.

CAWOOD, M.E; GELDERBLOM, W.C.A; VLEGGGAAR, R. Isolation of the Fumonisin Mycotoxins: A Quantitative Approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 1958 - 1962, 1991.

CONN, K. L; LAZAROVITS, G. Impact of animal manures on verticillium wilt potato scab, and soil microbial population. **Crop Protection and food Research**. v. 21, p. 81-92, 1999.

CRUZ, J. C; SILVA, G. H; PEREIRA FILHO, T. A; GONTIJO NETO, M. M; MAGALHÃES, P. C; PEREZ, D. M. Caracterização do cultivo de milho safrinha de alta produtividade em 2008 e 2009. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.9, n.2, p.177-188, 2010.

DESJARDINS, A. E; HOHN, T. M; McCORMICK S. P. Trichothecene Biosynthesis in *Fusarium* Species: Chemistry, Genetics, and Significance. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 3, p.595-604, 1993.

DU, L. ZHU, X; GERBER, R; HUVMAN, J; LOU, L; JORGENSEN, J; YU, F; ZALERA-RIVERA, K; WANG, Q. Biosynthesis of sphinganine-analog mycotoxins. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 35, p. 455-464, 2008.

EDRINGTON, L.F; KUBENA, R; HARVEY, B; ROTTINGHAUS, G.E. Influence of a superactivated charcoal on the toxic effects of aflatoxin or T-2 toxin in growing broilers. **Poultry Science**, v. 76, p. 1205-1211, 1997.

EL FARESI, W. A. **Estudo interativo entre o emprego da cama de frango como ração para bovinos em confinamento e a ocorrência de botulismo.** São Paulo: Edusp, 1995.

EMYGDIO, B. M; PEREIRA, L. R. BRS Missões: nova cultivar de milho para a região Sul do Brasil. **Pesquisa agropecuária brasileira.** Brasília, v.41, n.3, p.545-547, mar. 2006.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisas de Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos.** Rio de Janeiro, 1999.

EMPRAPA MILHO E SORGO. **Cultivo do milho, 4ª ed.,** 2008. Disponível em: <Milho/CultivodoMilho_4ed/index.htm> . Acesso em: 15 jun. 2010.

FANCELLI, A.L; LIMA, U.A. **Milho: produção, pré processamento e transformação agroindustrial.** São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio e Tecnologia/FEALQ, s.d. 112p. 1982. (Série Extensão Agroindustrial, 5).

FAO/WHO. Safety evaluation of certain mycotoxin in food, Fifty sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), FAO: Food and Nutrition Paper 74, **Who Food Additives**, Series 47, WHO, Geneva Switzerland, p. 419-555, 2001.

FAO- Food and Agriculture Organization (2001). **An introduction to mycotoxins.** Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/005/Y1390E/y1390e04.htm#bm04.4>>. Acesso em: 11 nov. 2009.

FARONI, L. R. D; SILVA, J. S. Manejo de pragas no ecossistema de grãos armazenados. Manejo de Pragas no Ecossistema de Grãos Armazenados, p.345-383. In J.S. Silva (ed.), **Secagem e armazenagem de produtos agrícolas.** Viçosa, Aprenda Fácil, 502p.

FIDELIS, R. R; MIRANDA, G. V; AFFERRI, S. F; PELUZIO, J. M. Reação de cultivares de milho a *Phaeosphaeria maydis* sob estresse de fósforo, no estado do Tocantins. Amazônia: **Ciência e Desenvolvimento.**, Belém, v.2, n.4, jan./jun. 2007.

FORNAZIERI, A. J. **Manual Brasil agrícola: principais produtos agrícolas.** - São Paulo, 2007. 527p.

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.

GELINEAU-VAN, W; 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.

GALVANO, F;PETRI, A; BERTUZZI, T; PIVA, A; CHIES, L; GALVANO, M. Activated carbons: In vitro affinity for ochratoxin A and deoxynivalenol and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. **International Association for Food Protection.** v. 61, n. 4, p. 469-475, 1998.

GERHARDSON, B. Biological substitutes for pesticides. **TRENDS in Biotechnology.** v. 20, n. 8, p. 338-343, 2002.

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**, Oxford, v.12, n.1-2, p.1247-1251, 1991.

GELDERBLOM, W. C. A; ABEL, S; SMUTS, C. M; MARNEWICK, J; MARASAS, W. F. O; LEMMER, E. R; RAMLJAK, D. Fumonisin-induced hepatocarcinogenesis: mechanisms related to cancer initiation and promotion. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v.109, n.2, p.291-300, 2001.

GELDERBLOM, W.C.A; RHEEDER,J.P; LEGOTT, N. Fumonisin contamination of a corn sample associated with the induction of hepatocarcinogenesis in rats - role of dietary deficiencies. **Food and Chemical Toxicology**, p. 471- 479, 2004.

GERAGE, A.C. A Cultura do Milho no Paraná. In: **Milho- Estratégias de Manejo Para a Região Sul**, 209 p., 2000.

GONÇALVES, S. L; CARAMORI, P. H; WREGEL, P. S; GERAGE, A. C. Épocas de semeadura do milho "safrinha", no Estado do Paraná, com menores riscos climáticos. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 5, p. 1287-1290, 2002.

GUMPRECHT, L. A; SMITH, G. W; CONSTABLE, P. C; HASCHEK, W. M. Species and organ specificity of fumonisin-induced endothelial alterations: Potential role in porcine pulmonary edema. **Toxicology**, v. 160, p. 71-79, 2001.

HAFNER, M; KUBUS, Z; FREUDENSCHUSS, M; BINDER, E. M; KRŠKA, R. Rapid fluorometric test the quantitative determination of deoxynivalenol in raw cereals. **Mycotoxin Research**. v.23, p. 3-6, 2007.

HASSEGAWA, R.H; FONSECA, H; FANCELLI, A.L; SILVA, V.N; SCHAMMASS, E.A; REIS, T.A; CORREA, B. Influence of Macro and Micronutrient Fertilization on Fungal Contamination and Fumonisin Production in Corn Grains. **Food Control**, v.19, p.36 - 43, 2008.

HASSEGAWA, R.H; ZORZETE, P; REIS, T.A; FANCELLI, A.L; FONSECA, H; ALMEIDA, A. P; CORREA, B. The nutrients effect on mycoflora, and for fumonisins and aflatoxins production in corn grain. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 65, n. 1, p. 21-26, 2006.

HATCH, R.C; CLARK, J.D; JAIN, A.V; WEISS R. Induced acute aflatoxicosis in goats. Treatment with activated charcoal or dual combinations of oxytetracycline, stanozolol, and activated charcoal. **American Journal of Veterinary Research** v. 43 , p. 644-648, 1982.

HEMP, S. Avaliação de Variedades de Milho em Cultivo Orgânico - Safra 2008-2009. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v. 4, n. 2, 2009.

HERMANN, G; PINTO, F. T; KITAZAWA, S. E; NOLL, I. B. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, n.26. p. 7-10, 2006.

HSU I. C; SMALIEY E. B; STRONG F. M; RIBELIN W. E. Identification of T-2 toxin in oldy corn associated with a lethal toxicosis in dairy cattle. **Applied and Environmental Microbiology**. v, 24, p. 685-690, 1972.

- HORN, D; ERNANI, P.R; SANGOI, L; SCHWEITZER, C; CASSOL, P.C. Parâmetros cinéticos e morfológicos da absorção de nutrientes em cultivares de milho com variabilidade genética contrastante. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v.30, n.1, p.77-85, 2006.
- HOROWITZ, N; MEURER, E.J. **Eficiência agrônômica de fosfatos naturais. In: Simpósio Sobre Fósforo Na Agricultura Brasileira**, Piracicaba, 2003. Anais. Piracicaba, Potafos/Anda, 2003. 24p.
- HUSSEIN, H.S; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v.167, p. 101-134, 2001.
- HUWIG, A., FREIMUND, S., KAPPELI, O., DUTLER, H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters** 122, 179-188, 2001.
- IAPAR. Cartas climáticas básicas do Estado do Paraná. **Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná**, 1987.
- IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201001comentari os.pdf>. Acesso em 20 de fev. de 2010.
- INDICAÇÕES técnicas para a cultura do milho no Estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: **Fepagro**, 2001. 135p
- JOUANY, J; YIANNIKOURIS, P; BERTIN, A, G. The chemical bonds between mycotoxins and cell wall components of *Saccharomyces cerevisiae* have been identified. **Archiva Zootechnica**, v.8, p. 26-50, 2005.
- JOUANY, J. P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal feed science and technology**. v.137, n. 3, p. 342-362, 2007.
- JUGENHEIMER, R.W. Corn improvement, seed production and uses. New York, John Wiley, 1985. 670p.
- KAWASHIMA, L. M; VALENTE S. L.M. Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, 1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e. Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 26, n. 3, Sept. 2006
- 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.
- KOKKONEN, M; OJALA, L; PARIKKA, P; JESTOI, M. Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 17-25, 2010.
- KOLLAR, R; REINHOLD, B.B; PETRAKOVA, E; YEH, H.J; ASHWELL, G; DRGONOVA, J. Architecture of the yeast cell wall. β (1—6)-glucan interconnects mannoprotein, β (1—3)-glucan, and chitin. The **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p.17762-17775, 1997.

KORNDORFER, G. H; LARA-CABEZAS, W. A; HOROWITZ, N. EFICIENCIA AGRONÔMICA DE FOSFATOS NATURAIS REATIVOS NA CULTURA DO MILHO. **Science and agriculture**. Piracicaba, v. 56, n. 2, 1999.

KOS, G; LOHNINGER, H; KRŠKA, R. Classification of Maize Contaminated with *Fusarium Graminearum* Using Mid-infrared Spectroscopy and Chemometrics. **Mycotoxin Research**. v.18, p. 104-108, 2002.

KOTAL, F; RADOVA, Z. A Simple Method for determination of desoxinivalenol in Cereals and Flours. **Czech Journal Food Science**. v. 20, p. 63-68, 2002.

KUCEY, R. M. N; JANZEN, H. H; LEGGET, M. E. Microbiologically mediated increases in plant-available phosphorus. **Advances in Agronomy**. New York, v. 42, p. 199-228, 1989.

LARKIN, R. P; FRAVEL, D. Efficacy of Various Fungal and Bacterial Biocontrol Organisms for Control of *Fusarium* Wilt of Tomato. **Plant Disease**, v. 82, n. 9, p. 1022-1028, 1998.

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** ., 77: 517-521, 1994.

LEATHWOOD, D. Tryptophan availability and serotonin synthesis. **Proceedings of the Nutrition Society**. n. 46, p.143-156, 1987.

LEIBETSEDER, J. Decontamination and detoxification of mycotoxins. **Biology of Nutrition in Growing Animals**. v. 4, p. 439-465, 2006.

LEMANCEAU, P. Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes: exemple des *Pseudomonas spp fluorescentes*. **Agronomie**. v. 12, p. 413-437, 1992.

LILLEHOJ, E.B. Feed sources and conditions conducive to production of aflatoxin, ochratoxin, *Fusarium* toxins and zearalenone. **JAVMA**, v. 163, p. 1281-1284, 1973.

LOPES, P. R; SOARES, P. Use of adsorbent in diets containing aflatoxin for silver catfish fingerlings. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 4, Apr. 2009

MAGAN, N; LACEY, J. Ecological determinants of mould growth in stored grain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 7, p. 245- 256, 1988.

MALLMANN, C. A; DILKIN, P; GIACOMINI, L. Z; RAUBER, R. H. Critérios para Seleção de um Bom Sequestrante para Micotoxinas. In: Conferência APINCO. Santos: **FACTA** - Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia, p. 213-224, 2006.

MARASAS, W.F.O. Discovery and Occurrence of the Fumonisin: A Historical Perspective. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 239 - 243, 2001.

MARASAS, W. F. O; RILEY, R. T; HENDRICKS, K. A; STEVENS, V. L; SADLER, T. W; WAES, J. G; MISSMER, S. A; CABRERA, J; TORRES, O; GELDERBLUM, W. C. A; ALLEGOOD, J; MARTÍNEZ, C; MADDOX, J; MILLER, J. D; STARR, L; SULLARDS, M. C; ROMAN, A. V; VOSS, K. A; WANG, E; MERRILL JR, A. H. Fumonisin Disrupts Sphingolipid Metabolism, Folate Transport, and Neural Tube Development in Embryo Culture and In Vivo: A Potential Risk Factor for Human Neural Tube Defects among

Populations Consuming Fumonisin Contaminated Maize. **The journal of nitritin**, p. 711-716, 2003.

MARIN, 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. **Letters in Applied Microbiology**. v.21, n. 5, p. 298-301, 1995.

MENEZES, R; IGNÁCIO S. C; SALCEDO, H. Mineralização de N após incorporação de fertilizantes orgânicos em um Neossolo Regolítico cultivado com milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.11, n.4, p.361-367, 2007.

MILANEZ, T. V; VALENTE-SOARES, L. M. Gas Chromatography - Mass Spectrometry Determination of Trichothecene Mycotoxins in Commercial Corn Harvested in the State of São Paulo, Brazil. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 17, n. 2, p. 412-416, 2006.

MILLER, J.D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research**, v.31, p.1-16, 1995.

MOAZAMI, E.F; JINAP, S. Natural occurrence of deoxynivalenol (DON) in wheat based noodles consumed in Malaysia. **Microchemical Journal**, v. 93, p. 25-28, 2009.

MOROOKA, N; URATSUJI, N; YOSHIZAWA, T; YAMAMOTO, H. Studies on the toxic substances in barley infected with *Fusarium* spp. *Jnp. J. Food Hygiene*. v. 13, n.4, p. 368-375, 1872.

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** 116, 220-226, 2009.

MUNKVOLD, G.P; DESJARDINS, A. E. Fumonisin in Maize: Can We Reduce Their Occurrence. **Plant Disease**, v. 81, n.6, p.556 - 565, 1997.

MUSSER, S.M; GAY, M.L; MAZZOLA, E.P; PLATTNER, R.D. Identification of a New Series of Fumonisin Containing 3-Hidroxyppyridine. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 970 - 972, 1997.

MUMPTON, F. A. *La roca magica*: Uses of natural zeolites in agriculture and industry. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 96, p. 3463-3470, 1999.

MYCOCK, D.J; BERJAK, P. The implications of seed associated mycoflora during storage. In: JAIME, K; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York-Basel: Hong-Kong, 1995. 853p.

NASS, L. L; PATERNIANI, E. Pre-breeding: a link between genetic resources and maize breeding. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 581-587, 2000.

NELSON, P.E; TOUSSON, T.A; MARASAS, W.F.O. *Fusarium* species - An illustrated manual for identification. Pennsylvania: **Pennsylvania State University Press**, 1983.

OLIVEIRA, M. S; PRADO, G; ABRANTES, F. M; SANTOS, L. G; VELOSO, T. Incidência de Aflatoxinas, Desoxinivalenol e Zearalenona em produtos comercializados em cidades do

estado de Minas Gerais no período de 1998 - 2000. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 61, p. 1-6, 2002.

OLIVEIRA, J. A; CARVALHO, M. L. M; VIEIRA, M. G. G. C; PINHO, E. V. R. P. Comportamento de sementes de milho colhidas por Diferentes métodos, sob condições de armazém Convencional. **Ciência e Agrotecnologia**. v.23, n.2, p.289-302, 1999.

OKOTH, S; SIAMETO, E. Suppression of *Fusarium* spp. in a maize and beans intercrop by soil fertility management. **Journal of Yeast and Fungal Research**. v. 1, n. 2, p. 35-43, 2010.

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

ONO, E. Y.S; BLAZON, L; DA SILVA, M; VIZONI, E; SUGIURA, Y.; UENO, Y; HIROOKA, E. Y. Fumonisin in corn: Correlation with *Fusarium* sp. count, damaged kernels, protein and lipid content. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 49, 63-71, 2006.

ONO, E. Y. S; SILVA, M; HASHIMOTO, E. H; VIZONI, E; KAWAMURA, O; SUGIURA, Y; HIROOKA, E. Y. Mycotoxicological quality evaluation of corn samples used by processing industries in the Northern region of Paraná State, Brazil. **Food Additives e Contaminants**. v. 25, p.1392 - 1399, 2008.

OSUNLAJA, S.O. Effect of organic soil amendments on the incidence of stalk rot of maize. **Plant and Soil**, The Hague, v.127, p.237-241, 1990.

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.

PAES, M. C. D. **Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho**. Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**, 2006. 6p. (Informe Técnico).

K.K; TILAK, K.V.B; SAXCNA, R. A.K; DEY R; SINGH, C.S. Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**. v. 156, p. 209-223, 2001.

PAPAIOANNOU, D; KATSOULOS, P. D; PANOUSIS, N; KARATZIAS, H. The role of natural and synthetic zeolites as feed additives on the prevention and/or the treatment 100 of certain farm animal diseases: A review. **Microporous esoporous Materials**, v. 84, p.161-170, 2005.

PATTEN, C. L. GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, n. 8, p. 3795-3801, 2002.

PINTO, N. F. J. A; VARGAS, E. A; PREIS, R. A. Qualidade sanitária e produção de fumonisina Bi em grãos de milho na fase de pré-colheita. **Summa phytopathol.**, Botucatu, v. 33, n. 3, Sept. 2007 .

- PESTKA, J. J; SMOLINSKI, A. T. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v.8, p. 39-69, 2005.
- PEDROSA, A.V.B; DEZEN, R.B. O milho: características do mercado e perspectivas. **Preços agrícolas**, v.55, p.1-4, 1991.
- 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.
- PRADO, G; OLIVEIRA, M. S; FERREIRA, S. O; CORREA, T. B. S; AFFONSO, B. R. R. Ocorrência natural de desoxinivalenol e toxina t-2 em milho pós-colheita. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.3, p. 259-262, 1997.
- REID, L. M; NICOL, R. W; OUELLET, T; SAVARD, M. J; MILLER, D; YOUNG, J. C; STEWART, D. W; SCHAAFSSMA, A. W. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in Maize Ears: Disease Progress, Fungal Biomass, and Mycotoxin Accumulation. **Phytopathology**. v.. 89, n. 11, p. 1028-1037, 1999.
- RHEEDER, J. P; MARASAS, W. F. O; VAN WYK, P. S. Fungal associations, in corn kernels and effects on germination. **Phytopathology**, v. 80, p. 131-134, 1990.
- RHEEDER, J.P; MARASAS, W.F.O; VISMER, H.F. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, n.5, v.68, p.2101-2105, 2002.
- ROCHA, O; ANSARI, K; DOOHAN, F. M. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. **Food Additives e Contaminants: Part A**, v.22, n. 4, p. 369-378, 2005.
- ROCHA, L. O; NAKAI, V. K; BRAGHINI, R; REIS, T. A; KOBASHIGAWA, E; CORREA, B. Mycoflora and Co-Occurrence of Fumonisins and Aflatoxins in Freshly Harvested Corn in Different Regions of Brazil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 11, p. 5090-5103, 2009.
- RODRIGUES, H; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 319-339, 1999.
- ROMANO, M. R. Desempenho de cinco variedades de milho crioulo em diferentes sistemas de produção. In: 5º Congresso Brasileiro de Agroecologia e territórios sustentáveis, 2007, Guarapari. 5º Congresso Brasileiro de Agroecologia. Porto Alegre: **Associação Brasileira de Agroecologia**, 2007.
- ROTTER, B. A; PRELUSKY, D. B; PESTKA, J. J. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). **Journal of Toxicology and Environmental Health**. v. 48, n. 1, p. 1-34,1996.
- RUSTOM, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed occurrence, legislation and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, v. 59, n. 1, 57-67, 1996.
- SABATER-VILAR, M; MALEKINEJAD, H; SELMAN, M.H.J; DOELEN, M.A.M; FINK-GREMMELS, J. *In vitro* assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxicoses. **Mycopathologia**. V.163, p. 81-90, 2007.

SADLER, T.W; MERRILL, ALFRED H; STEVENS, V. L; SULLARDS, M; WANG, C; WANG, E. Prevention of Fumonisin B₁ - Induced Neural Tube Defects by Folic Acid. **Teratology**, n. 66, p. 169-176 , 2002.

SAMSON, R.A; HOESKSTRA, E.S; FRISVAD, J.C; FILTENBORG, O. Occurrence of Food-Borne Fungi and Factors for Growth. In: _____. **Introduction to food-borne fungi**. 4.ed. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures. p.243-250, 1995. SANTOS, C.C; BELLINGIERI, P.A; FREITAS, J.C. Efeito da aplicação de compostos orgânicos de cama de frango nas propriedades químicas de Latossolo Vermelho Escuro cultivado com sorgo granífero. **Científica**, v. 32, no. 2, p.134-140, 2004.

SANTOS, J. **Controle de Pragas Durante o Armazenamento de Milho**. Circular Técnica, Sete Lagoas, MG, 2006.

SANTOS, J. S; OLIVEIRA, T. M; ALMEIDA FILHO, J. T. P; PIRES, J. L; ONO, E. Y. S; HIROOKA, E. Y. Desoxinivalenol em Trigo dos Estados do Rio Grande do Sul e Paraná. **Revista Ciência e Vida**. v, 28, p. 64-66, 2008.

SCOTT, P.M. Fumonisin - Mini Review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 18, p. 257 - 270, 1993.

SHELBY, R. A; WHITE, D. G; BAUSKE, E. M. Differential fumonisin production in maize hybrids. **Plant Disease**, 78, 582-584, 1994.

SEO, J.A; LEE, Y.W. Natural occurrence of the C Series of Fumonisin in Moldy Corn. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1331 - 1334, 1998.

SERAGENT, T; PARYS, M; GARSOU, S; PUSSEMIER, L; SCHNEIDER, Y; LARONDELLE, Y. Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular metabolism at realistic intestinal concentrations. **Toxicology Letters**, n. 164, p.167-176, 2006.

SHAHAROONA, B; NAVEED, M; ARSHAD, M; ZAHIR, Z. Fertilizer-dependent efficiency of *Pseudomonads* for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Applied Microbiology e Biotechnology**. v. 79, p. 147-155, 2008.

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

SHEHATA, I. S; RICHTER, W. I. F; SCHUSTER, M; SCHOLZ W; NOWAR, M. S. Adsorption of Ochratoxin A, Deoxynivalenol Zearalenone *in vitro* at different pH and adsorbents. **Mycotoxin Research**, v. 16, p. 136- 140, 1985.

SILVA, E. Manejo integrado de doenças na cultura do milho de safrinha. In: Seminário Nacional De Milho Safrinha. 2001, Londrina: **Iapar**, 2001.

SINGH, K; FRISVAD, J.C; THRANE, U; MATHUR, S.B. An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins. Hellerup/Denmark/: **Danish Government**, 1991.

SMITH, M. A; RILEY, R. Fumonisin Disruption of Ceramide Biosynthesis in Maize Roots and the Effects on Plant Development and *Fusarium verticillioides*-Induced Seedling Disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2937-2946, 2007.

SOUSA, D.M.G; LOBATO, E. Adubação fosfatada em solos da região do Cerrado. Piracicaba, Potafos, 2003. 16p.

SUDAKIN, D. L. Trichothecenes in the environment: relevance to human health. **Toxicology Letters**, n. 143, p. 97-107, 2003.

SUZUKI, H; RILEY, R. T; SHARMA, R. P. Inducible nitric oxide has protective effect on fumonisin B1 hepatotoxicity in mice via modulation of sphingosine kinase. **Toxicology**, v. 229, p. 42-53, 2007.

SYDENHAM, E.W; SHEPHARD, 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.

SYDENHAM, E. W; THIEL, P. G; MARASAS, W. F. O; SHEPHARD, G. S.,

SCHALKWYK, D. J. Van, KOCH, 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, n. 10, pp 1900-1903, 1990.

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

TANAKA, R. T; MASCARENHAS, H. A. A; BORKERT, C. M. Nutrição mineral da soja. In: ARANTES, N. E.; SOUZA, P. I. M. **Cultura da soja nos cerrados**. p. 109-110, 1997.

TRENHOLM, H. L; FRIEND, D.W; HAMILTON, R. M. G; PRELUSKY, D. B; FOSTER, B. C.. Lethal toxicity and nonspecific effects. In: Beasley, V.R. (Ed.), *Trichothecene Mycotoxicosis Pathophysiological Effects*, Vol. I, p. 107-141, 1989.

TURNER, P. C; NIKIEMA, P; WILD, C. P. Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. **Mutation Research**, v.443, p. 81-93, 1999.

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 fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. **Mycotoxin Research**, v.9, p.27-34, 1993.

UENO, Y.; IJIMA, K., WANG, S-D.; SUGIURA Y.; SEKIJIMA, M.; TNAKA, T.; CHEN,C.; YU, S-Z. Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver câncer: A 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. **Fd. Chem. Toxicol**, v.35, p.1143-1150, 1997.

U.S. FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION, 2001. **Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ChemicalContaminantsandPesticides/ucm109231.htm>>. Acesso em: 8 jun. 2010.

VIOLA, E. Crioulo resiste às adversidades. **Anuário brasileiro do milho 2003**. Cleiton Santos...[et al.] . Santa Cruz do Sul: Ed. Gazeta Santa Cruz, 2003. p.99-100 2003.

VISCONTI, A; MARASAS, W.F.O; MILLER, J.D; RILEY R. Mycotoxins of growing interest: Fumonisin. In. **Conference on Mycotoxins** Tunis, Tunisia, p. 3-6, 1999.

VISCONTI A. Problems associated with *Fusarium* mycotoxins in cereals. **Bulletin of the Institute for Comprehensive Agricultural Sciences Kinki University**, Nara, Japan, v. 9, p. 39-55, 2001.

WAES, G. 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. 146-153, 2009.

WANG, E; ROSS, P.F; WILSON, T.M; RILEY, R.T; MERRILL, A.H. Increases in Serum Sphingosine and Sphinganine and Decreases in Complex Sphingolipids in Ponies Given Feed Containing Fumonisin, Mycotoxins Produced by *Fusarium moniliforme*. **Journal of Nutrition**, v. 122, n. 8, p. 1706 - 1716, 1992.

WEGER, L. A; BIJ, A. J. V; DEKKERS, L. C; SIMONS, M; WIJFFELMAN, C. A; LUGTENBERG, B. J. J. Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant-beneficial Pseudomonads. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 17, p. 221-228, 1995.

WHITLOW, Lon W. **Evaluation of mycotoxin binders**. 2006. Disponível em <http://manc.umd.edu/2006_Complete_Proceedings.pdf#page=138> Acesso em: 15 jun. 2010.

WILLIAMS, L. D; GLENN, A. E; ZIMERI, A. M; BACON, C. W; SWEENEY, M. J; DOBSON, A.D.W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 141-158, 1998.

WHO - World Health Organization. **Fumonisin B1**. Geneva, 2000.

YAZAR, S; OMURTAG, G. Z. Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 2062-2090, 2008.

YAZDANI, M; BAHMANYAR, M. A; PIRDASHTI, H; ESMAILI, M. A. Effect of Phosphate Solubilization Microorganisms (PSM) and Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Yield and Yield Components of Corn (*Zea mays L*). **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 49, p. 90-92, 2009.

YIANNIKOURIS, A; ANDRE, G; PUGHON, L; FRANCOIS, J; DUSSAP, C.G; JEMINET, G; BERTIN, G; JOUANY, J. P. Chemical and Conformational Study of the Interactions Involved in Mycotoxin Complexation with β -D-Glucans. **Biomacromolecules**, v.7, p.1147-1155, 2006.

YIANNIKOURIS, A; ANDRE, G; BULEON, A; JEMINET, G; CANET, I; FRANCOIS, J; BERTIN, G; JOUANY, J. P. 2004. Comprehensive Conformational Study of Key Interactions Involved in Zearalenone Complexation with β -D-Glucans. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 2176-2185, 2004.

ZALETA-RIVERA, K; XU, C; YU, F; BUTCHKO, R. A, E. PROCTOR, R. H; HIDALGO-LARA, M; RAZA, A; DUSSAULT, P. H; DU, L. A Bidomain Nonribosomal Peptide Synthetase Encoded by *FUMI4* Catalyzes the Formation of Tricarballic Esters in the Biosynthesis of Fumonisin. **Biochemistry**, v. 45, p. 2561-2569, 2006.

ZAMBOLIM, L. **Sementes: qualidade fitossanitária**. 1.ed. Viçosa: UFV, 2005. 502p.

ZECH, W; SENESI, N; GUGGENBERGER, G; KAISER, K; LEHMANN, J; MIANO, T.M; MILTNER, A, SCHROTH, G. Factor controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. **Geoderma**, v. 79, p. 117-161, 1997.

ZHOU, T; HE, J; GONG, J. Microbial transformation of trichothecene mycotoxins. **World Mycotoxin Journal**, February, v.1, n. 1, p. 23-30, 2008.