



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUCIANA VON HOHENDORFF FERREIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SISTEMA DE PLANTIO E DA
FERTILIZAÇÃO NITROGENADA NA CONTAMINAÇÃO DE
MILHO POR FUMONISINAS E DE ADSORVENTE
INORGÂNICO E ORGÂNICO PARA AFLATOXINA B₁**

LUCIANA VON HOHENDORFF FERREIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SISTEMA DE PLANTIO E DA
FERTILIZAÇÃO NITROGENADA NA CONTAMINAÇÃO DE
MILHO POR FUMONISINAS E DE ADSORVENTE
INORGÂNICO E ORGÂNICO PARA AFLATOXINA B₁**

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.

Orientadora: Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono

Londrina
2010

LUCIANA VON HOHENDORFF FERREIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SISTEMA DE PLANTIO E DA
FERTILIZAÇÃO NITROGENADA NA CONTAMINAÇÃO DE MILHO
POR FUMONISINAS E DE ADSORVENTE INORGÂNICO E
ORGÂNICO PARA AFLATOXINA B₁**

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

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

Prof Dr Antônio Sérgio de Oliveira
COROL Cooperativa Agroindustrial –Rolândia – PR

Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio
UEL – Londrina - PR

Londrina, 04 de Maio de 2010.

Aos meus queridos pais, José Ferreira Júnior e Maria Madalena Von Hohendorff Ferreira, pela
compreensão, incentivo e carinho,
dedico.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono pela orientação e ensinamentos indispensáveis para a realização desse trabalho.

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

Ao Prof Dr. Antônio Sérgio de Oliveira pelo apoio, sugestões e disponibilidade dos materiais adsorventes para a realização desse trabalho.

À Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio pelas sugestões e colaboração no tratamento estatístico dos resultados dos testes de adsorção.

À Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka pelos ensinamentos e sugestões.

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

Aos Professores Dr. Martim Homechin (*in memoriam*) e Dr^a Débora Cristina Santiago pela colaboração.

Ao Prof Dr. Édio Vizoni pela colaboração no tratamento estatístico dos resultados da contaminação de milho por fumonisinas.

À Profa. Dra. Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade e o técnico Osvaldo Capello do Laboratório de Microscopia e Microanálise (UEL) pela colaboração na obtenção das imagens dos adsorventes.

À Cássia Reika Takabayashi pela indispensável ajuda e disposição para a realização dos testes de adsorção.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (CCE/UEL): Nelson Janeiro Rodriguez, Elda Jonas Aguiar, Sílvia Borba da Costa Avelino,

Sérgio Nascimento Evangelista, Sandra Aparecida Defende, Neusa Zamuner de Souza pela amizade, colaboração e auxílio.

Ao funcionário do Departamento de Química (CCE/UEL), Jurandir P. Pinto, pela amizade e auxílio.

Às funcionárias do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA/UEL) Patrícia Sambatti e Neusa Santos pela colaboração.

Aos amigos Elaine Cunha Moreno, Rafael Fernandes Santos, Anelize Bauermeister, Thaís Portantiolo Corrêa, Cristina de Melo, Aline de Souza, Adriana Petri, Ana Elisa Stefani, Carolina Nachi Rossi, Luciana Carvalho Grade, Michele Barreto, Tatiana Ávila Miguel e Virgínia Carla de Almeida Falcão pela amizade e companheirismo no decorrer do curso e no dia-a-dia.

À Luciana Bernd, Joice Sifuentes dos Santos, Dani Luce Doro da Silva, Thiago Montagner Souza, Angélica T. Ishikawa, Wagner Risso e Cleiton Inácio Ramos pela colaboração.

Aos estagiários Thais Lemes, Gervásio Hitoshi Saito e Camila Martins Kawakami pelo carinho, amizade e colaboração na realização desse trabalho.

Aos meus pais, José Ferreira Júnior e Maria Madalena von Hohendorff Ferreira pelo amor, compreensão, apoio, incentivo e carinho a mim dedicados, sem os quais não chegaria até aqui.

Aos meus irmãos, sobrinhos e demais familiares pelo carinho.

Ao Alysson Messias de Oliveira, pelo apoio, incentivo, carinho e compreensão.

A todos que contribuíram de alguma maneira para que o trabalho fosse finalizado.

O verdadeiro valor de um pesquisador
está em assimilar tanto os resultados esperados
como os resultados inesperados de uma experiência.

Claude Bernard (1813-1878)

FERREIRA, Luciana Von Hohendorff. **Avaliação do efeito do sistema de plantio e da fertilização nitrogenada na contaminação de milho por fumonisinas e de adsorvente inorgânico e orgânico para aflatoxina B₁**. 2010. 110. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos de ocorrência natural que contaminam uma ampla variedade de produtos agrícolas e causam prejuízos econômicos, além de riscos à saúde humana e animal. A prevenção por meio do manejo do solo na pré-colheita constitui o melhor método para controlar a contaminação por micotoxinas, porém, quando ocorre a contaminação, os riscos associados às toxinas devem ser controlados por meio de procedimentos na pós-colheita. Nesse estudo foi avaliada a contaminação fúngica natural e a contaminação por fumonisinas em 60 amostras de milho recém-colhido da região Norte do Paraná (safra 2008), sob diferentes sistemas de plantio (direto e convencional) e sucessão de culturas (aveia e pousio) no inverno e o efeito da aplicação de fertilizante nitrogenado (0; 22,5; 45,0; 67,5 e 90,0 Kg/ha) sobre a contaminação por fumonisinas, além da eficácia da mistura de adsorventes na proporção de 50% de aluminossilicato de sódio e cálcio hidratado (HSCAS) e 50% de parede celular de levedura na adsorção de AFB₁ *in vitro* por meio de planejamentos estatísticos 2⁴ e 2³ composto central para analisar os efeitos das variáveis experimentais em conjunto. Em relação à contaminação fúngica, *Penicillium* spp. foi o gênero prevalente, sendo detectado em 95 % das amostras, seguido de *Fusarium* spp. (78,33%) e *Aspergillus* spp. (10%). As concentrações de fumonisinas variaram de 0,26 a 3,84 µg/g, sendo as maiores médias detectadas nos sistemas de plantio convencional em sucessão a pousio e direto em sucessão a aveia, porém não diferiram significativamente dos demais sistemas de plantio pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). As médias da atividade de água dos grãos de milho variaram de 0,53 a 0,63, sendo que no sistema de plantio direto em sucessão a aveia as amostras apresentaram a maior média de a_w (0,63). A menor concentração média de fumonisinas foi detectada em milho cultivado na parcela que recebeu 67,5 Kg/ha de nitrogênio, porém não houve diferença significativa com os demais tratamentos pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Nos testes de adsorção de AFB₁ *in vitro*, o modelo do planejamento estatístico 2⁴ apresentou uma perda na visualização devido à variação experimental entre as variáveis, seguindo a direção do ponto máximo, sendo realizado um planejamento estatístico 2³, apresentando modelo quadrático estatisticamente significativo sem falta de ajuste no nível de 95% de confiança, com a concentração de toxina como única variável significativa. Ocorreu maior adsorção de AFB₁ em pH 7 (25 ng/mg) e pH 5 (20 ng/mg). Em pH 3,64 houve adsorção de 10 ng/mg, sendo necessário um aumento na concentração de toxina para uma maior adsorção, evidenciando que nas condições *in vitro* a mistura de adsorventes mostrou-se eficaz, apresentando boa adsorção na faixa de pH entre 5 e 7. Considerando os elevados prejuízos econômicos e os riscos à saúde humana e animal, os resultados desse estudo evidenciam a crescente preocupação com a qualidade de alimentos e rações, tornando imprescindível o controle de micotoxinas na pré e pós-colheita de produtos agrícolas a fim de minimizar a contaminação.

Palavras-chave: Micotoxinas. Milho. Sistemas de plantio e sucessão de culturas. Adsorventes. Planejamento estatístico.

FERREIRA, Luciana Von Hohendorff. **Evaluation of effect of planting system and nitrogen fertilization on corn contamination by fumonisins and organic and inorganic adsorbents for aflatoxin B₁**. 2010. 110. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

Mycotoxins are naturally occurring toxic secondary metabolites which contaminate a wide variety of agricultural products and cause serious economic losses in addition to risks to human and animal health. Prevention through pre-harvest management is the best method for controlling mycotoxin contamination, however, when contamination occurs, the risks associated with toxins should be controlled by post-harvest procedures. In this study the natural fungal contamination and fumonisin levels in 60 samples of freshly harvested corn from the northern region of Paraná State (2008 crop) under different planting systems (conventional and no-tillage) and crop successions (oats and fallow) in winter and the effect of nitrogen fertilizer application (0, 22.5, 45.0, 67.5 and 90.0 Kg ha⁻¹) on fumonisin contamination were evaluated. In addition, the effectiveness of the adsorbent mixtures (50% hydrated sodium calcium aluminosilicate – HSCAS + 50% yeast cell wall) *in vitro* adsorption of AFB₁ was analyzed by means of experimental designs 2⁴ and 2³ central composite in order to examine the effects of experimental variables together. Concerning the fungal contamination, *Penicillium* sp. was the prevalent genera, being detected in 95% of the samples, followed by *Fusarium* sp. (78.33%) and *Aspergillus* sp. (10%). Fumonisin levels ranged from 0.26 to 3.84 µg g⁻¹, and conventional till corn followed by fallow and no-till corn followed by oats showed the highest mean fumonisin levels, but there was no significant difference from the other planting systems by the Tukey test ($p < 0.05$). Water activity levels of corn ranged from 0.53 to 0.63, and no-till corn followed by oats showed the highest mean a_w (0.63). The lowest fumonisin level was detected in corn grown in the plot treated with 67.5 Kg ha⁻¹ nitrogen, but there was no significant difference from all the others by the Tukey test ($p < 0.05$). In the *in vitro* adsorption tests of AFB₁, the 2⁴ experimental design model showed a loss in the visualization due to the experimental variation among variables, following the direction of the maximum point. Then, 2³ central composite experimental design was carried out, which was statistically significant, with the quadratic model without lack of fit at 95% confidence having the toxin level as the only significant variable. AFB₁ showed the highest adsorption (25 and 20 ng mg⁻¹) at pH 7 and 5, respectively. At pH 3.64 there was an adsorption of 10 ng mg⁻¹, requiring an increase in the toxin level for further adsorption. These results indicated that the adsorbent mixture was effective with a good adsorption at pH range between 5 and 7. Taking into account the high economic losses and risks to human and animal health, there is an increasing concern about the quality of foods and feeds and its essential control of mycotoxins in agricultural products at pre- and post-harvest steps in order to minimize contamination.

Keywords: Mycotoxins. Corn. Cropping systems and crop successions. Adsorbents. Experimental design.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características físico-químicas das principais aflatoxinas	33
Tabela 2 – Limites máximos tolerados para aflatoxinas em alguns países.....	34
Tabela 3 – Adsorção in vitro de micotoxinas por diferentes adsorventes inorgânicos.	38
Tabela 4 – Adsorção in vitro de micotoxinas por diferentes adsorventes orgânicos.	39
Tabela 5 – Níveis do planejamento fatorial 24 com quadruplicata no ponto central com as variáveis codificadas e decodificadas para avaliar o efeito da concentração de afb1, do ph, do tempo de interação de afb1 com o adsorvente e da porcentagem de adsorvente sobre a adsorção de afb1 por 50 % de hscas e 50 % de parede celular de levedura.....	53
Tabela 6 – Níveis do planejamento fatorial 23 composto central com triplicata no ponto central com as variáveis codificadas e decodificadas para avaliar o efeito do ph, do tempo de interação de afb1 com o adsorvente e da concentração de afb1, com porcentagem de adsorvente fixa em 0,2 %.....	54

Artigo A

Tabela 1 – Contagem de <i>Fusarium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp. e bolores e leveduras em milho (n = 60) cultivado sob diferentes sistemas de plantio e sucessão de culturas na região norte do Paraná (safra 2008)	67
Tabela 2 – Concentrações de fumonisinas e atividade de água (a_w) de milho cultivado sob diferentes sistemas de plantio e sucessão de cultura (safra 2008) no norte do Paraná (n = 60).....	68
Tabela 3 – Concentrações médias de fumonisinas em milho cultivado sob sistema de plantio direto e convencional em sucessão a aveia e pousio em diferentes doses de ureia	69

Artigo B

Tabela 1 – Níveis do planejamento estatístico 2^4 com quadruplicata no ponto central com as variáveis codificadas e decodificadas para avaliar o	
---	--

	efeito da concentração de AFB ₁ , do pH, do tempo de interação de AFB ₁ com o adsorvente e da porcentagem de adsorvente sobre a adsorção de AFB ₁ por 50% de HSCAS e 50% de parede celular de levedura	79
Tabela 2	– Níveis do planejamento estatístico 2 ³ composto central com triplicata no ponto central com as variáveis codificadas e decodificadas para avaliar o efeito do pH, do tempo de interação de AFB ₁ com o adsorvente e da concentração de AFB ₁ , com porcentagem de adsorvente fixa em 0,2%	80
Tabela 3	– Resultados dos experimentos de adsorção <i>in vitro</i> de aflatoxina B ₁ baseados em planejamento estatístico 2 ³ composto central com triplicata no ponto central, em relação à quantidade adsorvida em ng de AFB ₁ /mg de adsorvente	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema dos componentes básicos de um grão de milho.....	20
Figura 2 – Estruturas químicas das micotoxinas de maior ocorrência.	22
Figura 3 – Estrutura química das fumonisinas b1, b2 e b3.....	25
Figura 4 – Via metabólica para a biossíntese de fumonisinas.	25
Figura 5 – À esquerda: plantio convencional com sucessão a aveia. À direita: plantio direto com sucessão a aveia.	26
Figura 6 – À esquerda: plantio direto com sucessão a pousio. À direita: plantio convencional com sucessão a pousio.	27
Figura 7 – Estruturas químicas das aflatoxinas b1, b2, g1, g2, m1 e m2.	31
Figura 8 – Estrutura química e modelo molecular da aflatoxina b1.....	31
Figura 9 – Via de biossíntese de aflatoxinas.	32
Figura 10 – Esquema ilustrando a hipótese de adsorção de aflatoxina b1 por hscas por meio de ligações de hidrogênio.....	40
Figura 11 – Estrutura das camadas de silicatos com fórmula química comum [si2o52-]xy das argilas minerais.	41
Figura 12 – Esquema da organização química da parede celular de <i>saccharomyces cerevisiae</i>	42
Figura 13 – Princípio do elisa competitivo para análise de micotoxinas	45
Figura 14 – Delineamento experimental para avaliação do efeito do sistema de plantio e da fertilização nitrogenada na contaminação de milho por fumonisinas.	47
Figura 15 – Fluxograma da contagem de bolores e leveduras.....	48
Figura 16 – Fluxograma da extração de fumonisinas.	50
Figura 17 – Fluxograma da determinação de fumonisinas.....	51
Figura 18 – Extração de aflatoxina b1.....	56
Figura 19 – Determinação de aflatoxinas.	57

Artigo A

Figura 1 – Frequência relativa dos principais gêneros fúngicos em milho recém- colhido (n = 60) da safra 2008 da região Norte do Paraná.....	65
--	----

Artigo B

Figura 1 – Curvas de nível das respostas do planejamento estatístico 2³ 83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
FAO	Food and Agriculture Organization
JECFA	Joint Expert Committee on Food Additives of the United Nations
EFSA	European Food Safety Authority
IARC	International Agency of Research on Cancer
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
FDA	Food and Drug Administration
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
SPE	Solid Phase Extraction
HSCAS	Aluminossilicato de Sódio e Cálcio Hidratado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVOS GERAIS	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	MILHO	19
3.2	MICOTOXINAS	21
3.3	FUMONISINAS	24
3.4	SISTEMAS DE PLANTIO E FERTILIZAÇÃO NITROGENADA	26
3.5	AFLATOXINAS	30
3.5.1	Via de Biossíntese	31
3.5.2	Características Físicas e Químicas	33
3.6	CONTROLE DE MICOTOXINAS	35
3.7	MÉTODOS DE DESCONTAMINAÇÃO	36
3.7.1	Utilização de Adsorventes	36
3.7.2	Tipos de Adsorventes	38
3.7.2.1	Aluminossilicatos (zeólitas, HSCAS, argilas)	40
3.7.2.2	Levedura e extrato de levedura	41
3.8	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1	PADRÕES E REAGENTES	46
4.2	AMOSTRAS DE MILHO	46
4.2.1	Sistema de Plantio e Sucessão de Cultura	46
4.2.2	Análise da Microbiota Fúngica	47
4.3	ANÁLISE DE FUMONISINAS	49
4.3.1	Extração de Fumonisinas	49
4.3.2	Determinação de Fumonisinas	49
4.3.3	Determinação da Atividade de Água	51
4.3.4	Análise Estatística	51

4.4	ANÁLISE DE AFLATOXINA B1	52	
4.4.1	Delineamento Experimental para a Adsorção de Aflatoxina B1 in vitro.....	52	
4.4.4.1	Planejamento estatístico 24.....	53	
4.4.4.2	Planejamento estatístico 23.....	54	
4.4.2	Ensaio de Adsorção de AFB1 in vitro	55	
4.4.3	Extração de AFB1	55	
4.4.4	Determinação de AFB1	56	
4.4.5	Análise Estatística	58	
4.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DOS ADSORVENTES.....	58	
4.6	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO.....	58	
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59	
ARTIGO A – EFEITO DO SISTEMA DE PLANTIO E DA FERTILIZAÇÃO			
NITROGENADA NA CONTAMINAÇÃO DE MILHO POR			
FUMONISINAS.....			60
ARTIGO B – AVALIAÇÃO DE ADSORVENTE INORGÂNICO E			
ORGÂNICO PARA AFLATOXINA B1 IN VITRO			74
REFERÊNCIAS			89
ANEXOS			99
ANEXO A – Microscopia Eletrônica de Varredura da Superfície dos Adsorventes			100
ANEXO B – Espectros de Absorção no Infravermelho Antes e Após a Realização			
do Teste de Adsorção de AFB1			101

1 INTRODUÇÃO

Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos de ocorrência natural, produzidas por fungos que contaminam ampla variedade de produtos agrícolas, como milho, nozes, amêndoas, amendoim e frutas. A contaminação pode ocorrer no campo, durante o desenvolvimento de culturas vegetais, na pós-colheita, nas etapas de transporte e armazenagem, quando os fungos encontram condições de temperatura e umidade propícias para produção dessas toxinas.

As micotoxinas são produzidas por fungos filamentosos de diferentes espécies, principalmente dos gêneros *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Claviceps* spp. e *Alternaria* spp. Compreendem um grupo de diferentes compostos químicos com efeitos citotóxicos, carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos e estrogênicos. As micotoxinas mais frequentes são aflatoxinas, ocratoxina A, tricotecenos (desoxinivalenol, nivalenol, toxina T-2), zearalenona e fumonisinas.

Além dos riscos à saúde humana e animal, a ocorrência de micotoxinas implica em prejuízos econômicos, uma vez que micotoxicoses em animais destinados ao comércio e abate como frangos e suínos, comprometem o desenvolvimento, resultando em perdas de produtividade. Deve-se ressaltar que muitos países importadores possuem legislações rígidas para o limite máximo de micotoxinas permitido para determinados alimentos, constituindo barreiras para o comércio de produtos agrícolas e derivados.

Considerando a frequência de contaminação de milho por fungos toxigênicos e micotoxinas, torna-se necessária a busca por alternativas que garantam a produtividade e qualidade do produto. Dentre essas alternativas o emprego de práticas agrícolas adequadas e o constante monitoramento da cadeia produtiva do milho são fundamentais a fim de minimizar os riscos à saúde humana e animal.

O Brasil é o 3º maior produtor mundial de milho com 4,9 % da produção, superado apenas pelos Estados Unidos e China que respondem por 40,2 % e 19,2 % da produção, respectivamente. Dados da CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) no período entre 1993 até 2006 comprovam os rendimentos da cultura para o país, mostrando um aumento na produtividade de 930 Kg/ha e na produção de 13 milhões de toneladas. O Estado do Paraná é o maior produtor, sendo responsável por 24,4% da produção nacional.

A prevenção por meio do manejo do solo na pré-colheita constitui o melhor método para controlar a contaminação por micotoxinas, porém, quando ocorre contaminação,

os riscos associados às toxinas devem ser controlados por meio de procedimentos na pós-colheita, caso o produto seja utilizado na alimentação humana ou animal. De maneira ideal, os riscos associados à contaminação por micotoxinas devem ser minimizados por um sistema de gestão integrada em todas as fases da produção, isto é, pré-colheita, colheita e processamento pós-colheita.

O sistema de plantio direto vem se consolidando como uma das práticas eficazes para melhorar a sustentabilidade dos recursos naturais na agricultura. Nesse sistema o solo não é revolvido, mas protegido por resíduos vegetais de culturas anteriores, onde as sementes são colocadas em sulcos ou covas com largura e profundidade adequada para sua cobertura e contato com o solo. O seu emprego em substituição ao sistema de plantio convencional apresenta vantagens, como eliminação de operações de gradagem, aração, escarificação, aumento da fertilidade do solo, redução do uso de fertilizantes e das perdas por erosão. Também favorece o aumento da diversidade da biota do solo, conferida pela proteção dos resíduos vegetais.

Um grande número de métodos físicos, químicos e biológicos de detoxicação de micotoxinas foi estudado, mas esses métodos têm sido empregados com sucesso limitado. Uma das abordagens mais encorajadoras para resolver o problema é o uso de materiais adsorventes não-nutritivos na dieta para reduzir a absorção gastrointestinal de micotoxinas.

Os adsorventes são estudados particularmente em relação à eficácia, especificidade e mecanismo do processo de adsorção. A eficácia da ligação das micotoxinas é dependente da estrutura cristalina e propriedades físicas do adsorvente, bem como das propriedades físicas e químicas das micotoxinas. Os adsorventes devem ser efetivos contra uma ampla gama de micotoxinas, econômicos, utilizar tecnologia acessível, gerar produtos atóxicos, não afetar a palatabilidade e as propriedades nutricionais do alimento, não devendo possuir nenhuma afinidade por pigmentos, promotores de crescimento, vitaminas, minerais e aminoácidos.

Considerando os elevados prejuízos econômicos e os riscos à saúde humana e animal, existe uma crescente preocupação com a qualidade de alimentos e rações, portanto torna-se imprescindível o controle de micotoxinas na pré e pós-colheita de produtos agrícolas a fim de minimizar a contaminação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito do sistema de plantio e da fertilização nitrogenada na contaminação de milho por fumonisinas, assim como a adsorção de aflatoxina B₁ *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a microbiota fúngica em milho cultivado sob os sistemas de plantio direto e convencional em sucessão à aveia e a pousio e diferentes doses de fertilizante nitrogenado;
- Determinar as concentrações de fumonisinas B₁ e B₂ em milho sob sistemas de plantio direto e convencional em sucessão à aveia e a pousio e diferentes doses de fertilizante nitrogenado;
- Avaliar a eficiência da mistura de adsorventes (50% de parede celular de levedura e 50% de aluminossilicato de sódio e cálcio hidratado) na remoção de aflatoxina B₁ *in vitro* em diferentes concentrações de toxina, pH, tempo de interação da toxina com o adsorvente e porcentagem de adsorvente utilizando planejamento estatístico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MILHO

Consumido pelos povos americanos desde o ano 5000 a.C., o milho tem sido a alimentação básica de várias civilizações importantes ao longo dos séculos. Os Maias, Astecas e Incas reverenciavam o cereal na arte e religião e grande parte de suas atividades diárias eram ligadas ao seu cultivo. Com a descoberta da América e as grandes navegações do século XVI, a cultura do milho se expandiu para outras partes do mundo. Hoje é cultivado e consumido em todos os continentes e sua produção só perde para a do trigo e do arroz. Encontram-se, hoje, aproximadamente 150 espécies de milho, com grande diversidade de cor e formato dos grãos (ABIMILHO, 2006).

No Brasil, o cultivo de milho tem sido realizado desde antes do descobrimento. Os índios, principalmente os guaranis, utilizavam o cereal como o principal ingrediente de sua dieta. Com a chegada dos portugueses, o consumo aumentou e novos produtos à base de milho foram incorporados aos hábitos alimentares dos brasileiros (ABIMILHO, 2006).

A partir da segunda metade do século XX, o desenvolvimento de espécies híbridas aumentou a produtividade e a qualidade do milho. No Brasil, esta é uma cultura que ocupa extensas áreas. Dentre as principais regiões produtoras estão o noroeste e sudoeste do Paraná, Triângulo Mineiro, oeste de São Paulo e Vale do Taquari e Rio Grande do Sul (ABIMILHO, 2006).

Dentro da classificação botânica, o milho pertence à ordem *Gramineae*, família *Poaceae*, sub-família *Panicoideae*, gênero *Zea*, espécie *mays*. O milho passou a ser *Zea mays* L. spp., uma vez que no México existe uma espécie selvagem chamada teosinte, com nome científico *Zea mays*, com suas subespécies diferenciadas do milho, como *Zea mays* spp. mexicana, *Zea mays perennis*, dentre outros. Ao referir-se ao milho, é essencial e obrigatório que se mencione o nome do cientista (*Zea mays* Linné) (PATERNIANI e CAMPOS, 1999).

Os componentes básicos de um grão de milho são (Figura 1):

- Pericarpo;
- Endosperma;
- Película ou casca;
- Embrião;
- Pedúnculo.

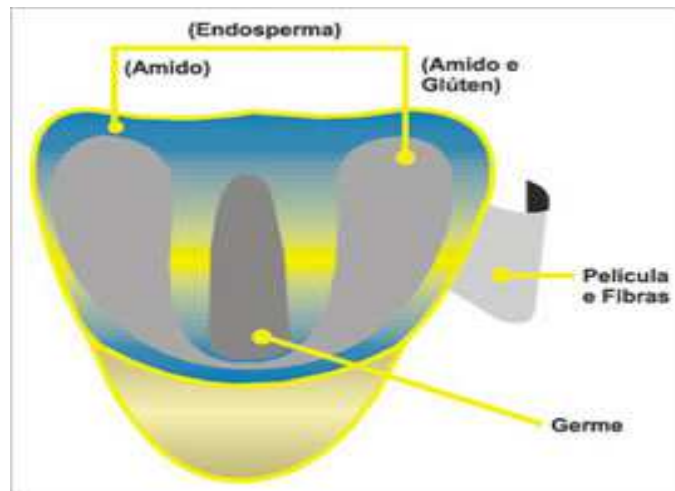


Figura 1 – Esquema dos componentes básicos de um grão de milho.
Fonte: Abimilho (2006).

Cerca de 15% da produção nacional de milho destina-se ao consumo humano, seja em sua forma natural ou como subproduto em pães e farinhas e de maneira indireta na composição de outros produtos. Na alimentação animal, aproximadamente 65% é destinado à produção de ração (ABIMILHO, 2006).

A baixa produtividade e qualidade dos grãos podem estar relacionadas com a contaminação por microrganismos, condições climáticas e às práticas agrícolas inadequadas (PEREIRA, 1995). As práticas agrícolas podem influenciar na incidência e gravidade das doenças do milho. Diferenças quanto às exigências nutricionais da cultura, tipo de cobertura do solo e os restos culturais são fatores que favorecem a população de patógenos antes da semeadura do milho (NAZARENO, 1981).

3.2 MICOTOXINAS

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos de ocorrência natural produzidas por fungos filamentosos como *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Claviceps* spp. e *Alternaria* spp., durante as etapas de pré-colheita, transporte e armazenamento de alimentos (HUSSEIN e BRASEL, 2001; SWEENEY e DOBSON, 1998; STOEV, HALD e MANTLE, 1998).

O termo micotoxina é uma combinação da palavra grega ‘*mykes*’, significando fungo, e da palavra latina ‘*toxicum*’, significando tóxico (TURNER, SUBRAHMANYAM, PILETSKY, 2009). Surgiu em 1962, como resultado de uma crise veterinária incomum próximo a Londres, Inglaterra, em que aproximadamente 100 mil filhotes de peru morreram (FORGACS e CARLL, 1962; BENNETT e KLICH, 2003). Quando esse misterioso mal foi relacionado à torta de amendoim contaminada com metabólitos secundários de *Aspergillus flavus* (aflatoxinas), sensibilizou os cientistas da possibilidade de outros metabólitos ocultos de fungos poderem causar mortandade. Assim, a categoria micotoxina foi estendida para incluir um número de toxinas fúngicas previamente conhecidas (como ergotaminas), alguns compostos originalmente isolados como antibióticos (patulina), e um número de novos metabólitos secundários revelados em triagens com o objetivo de descobrir micotoxinas (como a ocratoxina A) (MAGGON, GUPTA E VENKITASUBRAMANIAN, 1977).

A presença de micotoxinas na alimentação humana e animal tem sido observada desde o surgimento da produção agrícola intensiva. O ergotismo é citado no Velho Testamento da Bíblia e analisando-se os registros de alguns episódios de doenças e óbitos ao longo da História, desde os tempos medievais na Europa até a época da colonização inglesa na América do Norte, pode-se verificar que alguns foram causados pela presença de micotoxinas nos alimentos (MILLER, 1995).

A contaminação dos produtos vegetais ocorre pelos esporos do fungo, presentes no ambiente, sobretudo no solo, durante os procedimentos de colheita e secagem. A utilização de práticas agrícolas inadequadas, que prolongam o contato dos produtos com o solo, as lesões na superfície dos grãos provocadas por insetos, o armazenamento inadequado em locais úmidos e sem ventilação, são apontados como as principais causas que favorecem a contaminação e o desenvolvimento de fungos toxigênicos (CHU, 1991).

De acordo com Pitt e Hocking (1997), os principais fatores que afetam o crescimento de fungos em alimentos são a disponibilidade de água livre (atividade de água), o efeito de solutos específicos, a concentração de íons hidrogênio (pH), a temperatura de processamento e estocagem, a atmosfera de armazenamento, a consistência do alimento, as características nutricionais e o efeito dos conservantes. Esses fatores não atuam isoladamente sobre os microrganismos, e sim de forma combinada, o que resulta em sinergismo (PITT e HOCKING, 1997).

Os fungos toxigênicos são conhecidos por produzirem metabólitos secundários, entretanto, nem todos os fungos são toxigênicos e nem todos os metabólitos secundários de fungos são tóxicos (HUSSEIN e BRASEL, 2001).

As micotoxinas incluem compostos quimicamente heterogêneos de baixa massa molecular (SWEENEY e DOBSON, 1998; BENNETT e KLICH, 2003), que desencadeiam efeitos tóxicos em vertebrados e invertebrados (BENNETT e KLICH, 2003). As de maior ocorrência são aflatoxinas, ocratoxina A, tricotecenos (desoxinivalenol, nivalenol e toxina T-2), zearalenona e fumonisinas (Figura 2) (HUWIG *et al.*, 2001).

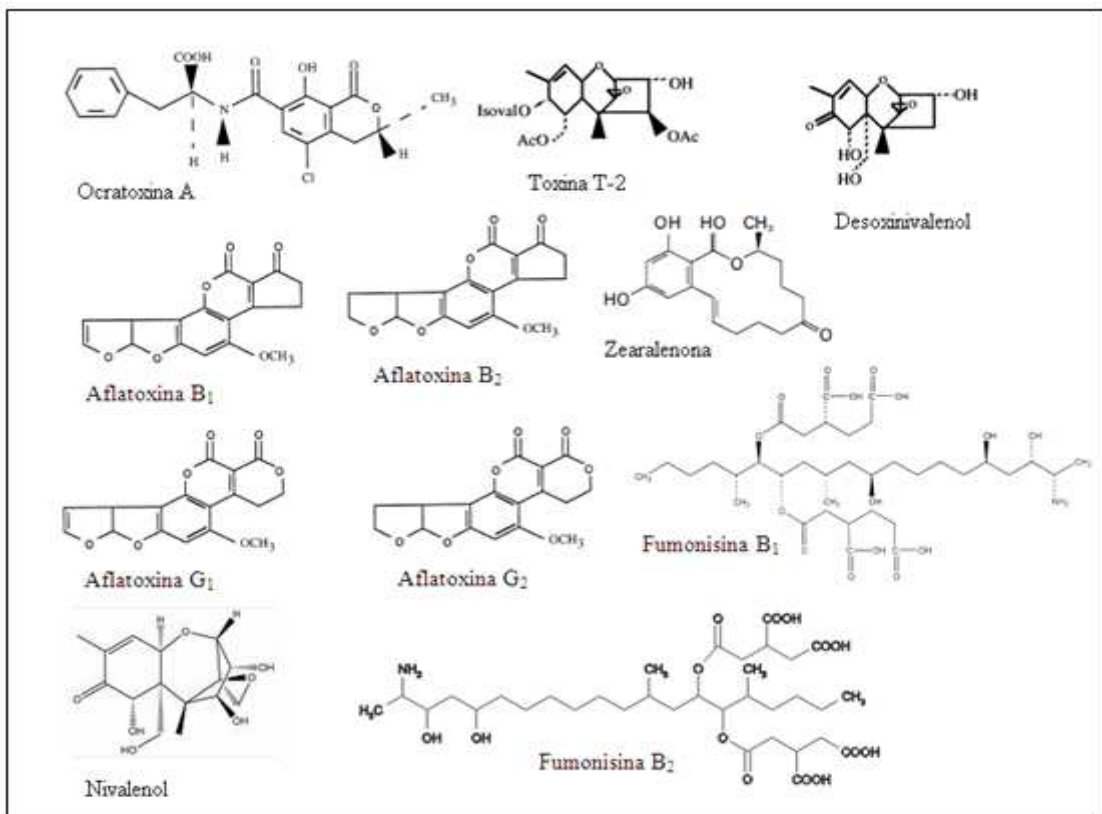


Figura 2 – Estruturas químicas das micotoxinas de maior ocorrência.
Fonte: Sweeney e Dobson (1998).

As micotoxinas são de difícil definição e classificação. Devido às suas diversas estruturas químicas e origens biossintéticas, seus inúmeros efeitos biológicos, e sua produção por um vasto número de diferentes espécies de fungos, os esquemas de classificação tendem a refletir a formação do profissional responsável pela categorização. Os clínicos frequentemente as organizam pelo órgão que afetam. Assim, as micotoxinas podem ser classificadas como hepatotoxinas, nefrotoxinas, neurotoxinas, imunotoxinas, e assim por diante. Os biólogos celulares incluíram-nas em grupos genéricos como teratogênicas, mutagênicas, carcinogênicas, e alergênicas. Os químicos orgânicos têm procurado classificá-las por suas estruturas químicas (lactonas, cumarinas); bioquímicos de acordo com suas origens biossintéticas (policetidas, derivados de aminoácidos, etc); médicos pelas doenças que elas causam (fogo de Santo Antonio, estaquibotriotoxicose), e micologistas pelos fungos que as produzem (toxinas de *Aspergillus*, toxinas de *Penicillium*). Nenhuma dessas classificações é plenamente satisfatória (VAN EGMOND e SCHOTHORST, 2007).

De acordo com as estimativas da “Food and Agriculture Organization” (FAO), aproximadamente 25% da produção alimentar mundial está contaminada com, pelo menos, uma micotoxina (STOEV, HALD e MANTLE, 1998; HUSSEIN e BRASEL, 2001).

Em nível mundial, a contaminação de alimentos com micotoxinas é um problema significativo (HUSSEIN e BRASEL, 2001). Regulamentações relativas às micotoxinas têm sido estabelecidas em muitos países a fim de proteger o consumidor dos efeitos nocivos desses compostos. Diferentes fatores influenciam no processo do estabelecimento de limites para micotoxinas, incluindo fatores científicos como a disponibilidade de dados toxicológicos e dados relativos à ocorrência, conhecimento detalhado sobre as possibilidades de amostragem e análise, além de questões sócio-econômicas. Até o final dos anos 1990, o estabelecimento de regulamentações para micotoxinas foi principalmente uma questão nacional. Gradualmente, diversas comunidades econômicas, como EU (União Européia), MERCOSUL (Mercado Comum do Sul), Austrália e Nova Zelândia harmonizaram suas regulamentações para micotoxinas, anulando, assim, as regulamentações nacionais existentes.

No final de 2003, aproximadamente 100 países (correspondendo a cerca de 85% dos habitantes do mundo) possuíam regulamentação específica ou orientações detalhadas para micotoxinas em alimentos. As regulamentações foram relacionadas às aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁), tricotecenos (desoxinivalenol, diacetoxiscirpenol, toxina T-2 e toxina HT-2), fumonisinas (B₁, B₂ e B₃), ácido agárico, ergotaminas, ocratoxina A, patulina, fomopsinas, esterigmatocistina e zearalenona. As regulamentações atuais estão cada vez mais baseadas em

pareceres científicos, como FAO/ WHO “Joint Expert Committee on Food Additives of the United Nations” (JECFA) e “European Food Safety Authority” (EFSA) (VAN EGMOND e SCHOTHORST, 2007).

3.3 FUMONISINAS

Fumonisinias constituem uma classe de micotoxinas produzidas principalmente por *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (*F. moniliforme* Sheldon, fase teleomórfica *Gibberella moniliformis* Wineland), principal contaminante de milho e derivados em toda parte do mundo (SAMSON e REENEN-HOEKSTRA, 1988; RHEEDER, MARASAS e VISMER, 2002; WANG *et al.*, 2008). *F. proliferatum*, *F. nygamai* e *Alternaria alternata* sp. *lycopersici* são também produtores de fumonisinias (RHEEDER, MARASAS e VISMER, 2002).

Pelo menos 28 análogos foram caracterizados e classificados em quatro principais grupos, as séries de fumonisinias A, B, C e P. Na série B existem os análogos mais abundantes, sendo a fumonisinina B₁ (FB₁) o constituinte mais tóxico e de maior ocorrência, respondendo por aproximadamente 70% do total de fumonisinias encontradas naturalmente (RHEEDER, MARASAS e VISMER, 2002; WANG *et al.*, 2008), enquanto FB₂ e FB₃ respondem por cerca de 15 a 25% e 3 a 8%, respectivamente (Figura 3) (RHEEDER, MARASAS e VISMER, 2002).

A estrutura química básica das fumonisinias são diésteres de propano-1,2,3-ácido tricarbóxico e um pentaidroxieicosano contendo um grupo amino primário (BEZUIDENHOUT *et al.*, 1988). Apresentam estrutura similar à esfingosina, que formam os esfingolípídios (SWEENEY e DOBSON, 1998).

As fumonisinias são sintetizadas por meio da condensação do aminoácido alanina a um precursor derivado de acetato (Figura 4). Grupos metila da cadeia ramificada são adicionados aos carbonos 12 e 16 por uma S-adenosil metionina transferase. A ordem e o número de etapas subsequentes na via metabólica envolvem a oxigenação e posterior esterificação dos derivados acetato, que são ainda desconhecidos (SWEENEY e DOBSON, 1998).

Podem afetar os animais de diferentes formas pela interferência com o metabolismo dos esfingolípídios. Causam leucoencefalomalácia em equinos e coelhos,

edemas pulmonares e hidrotorax em suínos, efeitos hepatotóxicos e carcinogênicos e apoptose em fígado de ratos (SHETTY e BHAT, 1998; BENNETT e KLICH, 2003; KUMAR, BASU e RAJENDRAN, 2008). Em humanos, há uma provável associação com câncer esofágico e foram classificadas pelo “International Agency of Research on Cancer” (IARC) (1993) como carcinógenos do grupo 2B (RHEEDER, MARASAS e VISMER, 2002; BENNETT e KLICH, 2003; KUMAR, BASU e RAJENDRAN, 2008).

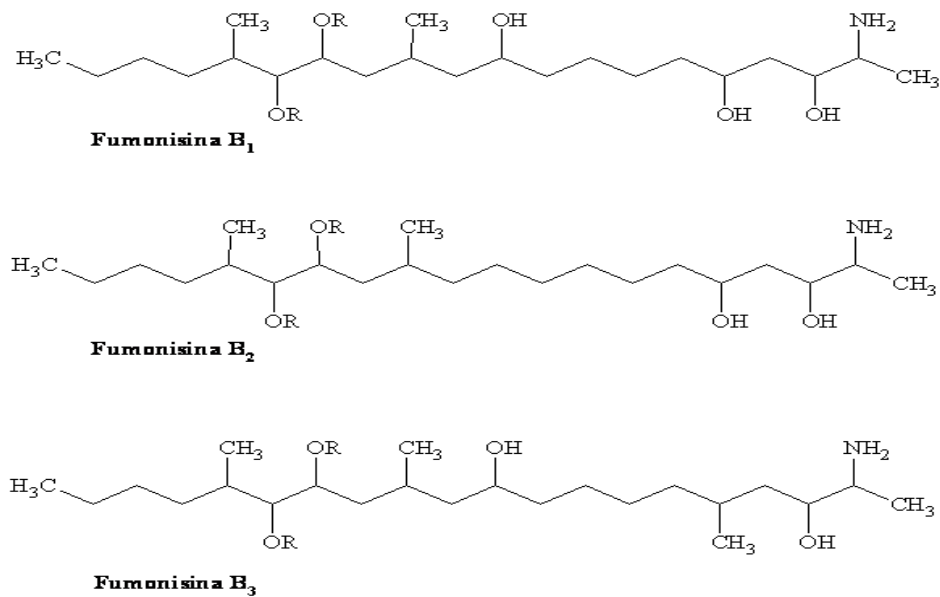


Figura 3 – Estrutura química das fumonisinas B₁, B₂ e B₃.

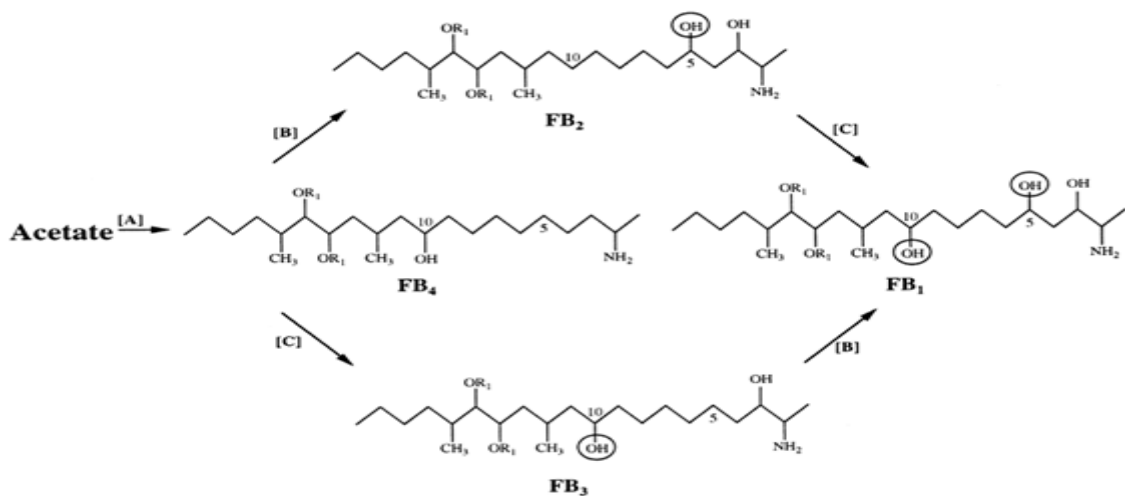


Figura 4 – Via metabólica para a biossíntese de fumonisinas.

Fonte: Sweeney e Dobson (1998).

3.4 SISTEMAS DE PLANTIO E FERTILIZAÇÃO NITROGENADA

Os diferentes sistemas de cultivo (Figuras 5 e 6) promovem diferentes graus de mobilização do solo, causando alteração nas propriedades físicas e químicas que afetam os microrganismos do solo, como bactérias, fungos e actinomicetos. Dessa forma, o sistema de plantio convencional (SPC), diferente do sistema de plantio direto (SPD), caracteriza-se por uma mobilização e incorporação total dos resíduos no solo, deixando sua superfície desprotegida até o estabelecimento da próxima cultura, refletindo em alterações qualitativas e quantitativas na população de microrganismos (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

No Brasil, o plantio direto é o sistema frequentemente utilizado em cultivos de milho, principalmente na “safrinha”, devido à maior exploração da área agrícola. O sistema convencional é ainda predominante entre pequenos produtores, embora seja crescente a adoção do plantio direto (CONAB, 2009).



Figura 5 – À esquerda: plantio convencional com sucessão a aveia. À direita: plantio direto com sucessão a aveia.

Fonte: Moreno (2008).



Figura 6 – À esquerda: plantio direto com sucessão a pousio. À direita: plantio convencional com sucessão a pousio.

Fonte: Moreno (2008).

Considerado como um dos maiores avanços da agricultura brasileira, o SPD foi introduzido no Sul do Brasil no início da década de 1970 (COSTA e XAUD, 2007), tendo como objetivo principal o controle da erosão hídrica. É considerado um sistema conservacionista do solo, no qual a introdução da semente é realizada em sulco ou cova sob solo não revolvido (DERPSCH, 1984).

O sistema de plantio direto tem sido uma das melhores alternativas para a manutenção da sustentabilidade dos recursos naturais na utilização agrícola dos solos. Ao se adotar o SPD, perdem-se menos solo, água e nutrientes por erosão em relação ao SPC, em virtude da não-desagregação do solo e da manutenção de cobertura vegetal e palha na sua superfície. Por apresentar benefício ambiental amplo, é possível que o SPD seja a contribuição mais importante que a agricultura está realizando em termos de preservação ambiental, pois, não havendo remoção de partículas, há menor perda de fertilizantes e agroquímicos, resultando em menor poluição das águas superficiais (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

O SPD, associado a sistemas de culturas com elevado aporte de resíduos, favorece o acúmulo de grande quantidade de carbono orgânico (CO) no solo, tornando-o um importante dreno de CO₂ da atmosfera e contribuindo para a mitigação dos efeitos desse gás

no aquecimento global, denominado efeito estufa. Os estoques de CO dos solos em SPD são maiores que em SPC e, em alguns casos, maiores que os de solos sob vegetação natural, dependendo do aporte de resíduos vegetais do sistema de cultura utilizado (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Adicionalmente, a rotação de culturas envolvendo plantas leguminosas é frequentemente descrita como benéfica para o solo, fornecendo nitrogênio e fonte de carbono para a microbiota do solo de culturas posteriores, e minimizando a erosão (DRURY *et al.*, 2004).

Quando a safra é colhida, os resíduos permanecem no campo e fornecem ambiente propício à sobrevivência de esporos de fungos e subsequente contaminação da próxima safra. O manejo adequado dos resíduos de culturas evita esse problema. A rotação adequada pode, portanto, prevenir a contaminação por micotoxinas (LOPEZ-GARCIA, PARK e PHILLIPS, 1999). Assim, o sistema de semeadura e sucessão de culturas apresenta grande importância no controle fitossanitário da cultura do milho.

Métodos de produção e conservação capazes de combater a deterioração por fungos e produção de micotoxinas são de grande interesse devido à utilização intensiva da cultura de milho. Um desses métodos é o suprimento de quantidades adequadas de minerais, tanto macro e micronutrientes, para o adequado desenvolvimento da planta e para a proteção contra fungos. Contudo, a deficiência ou o excesso de nutrientes essenciais pode influenciar na incidência de doenças causadas por fungos, bem como na produção de micotoxinas em grãos (MUZILLI, 1981b).

A produtividade do milho pode ser correlacionada com a disponibilidade de nitrogênio, sendo esse componente de várias moléculas de proteínas, enzimas, coenzimas, ácidos nucleicos e citocromos. É uma cultura exigente desse elemento e a sua falta leva à deficiência nas folhas, redução do tamanho das espigas e espessura dos colmos, levando ao quebramento da planta, enquanto seu excesso provoca crescimento vegetativo da planta, tornando as folhas mais expostas a patógenos e a parede celular mais fina e vulnerável à penetração de fungos (MUZILLI, 1981b). A adubação com fertilizantes nitrogenados aumenta a produtividade dos grãos de milho, assim como a matéria seca da parte aérea da planta, conforme o aumento das doses (ARAÚJO, FERREIRA e CRUZ, 2004).

Blandino, Reyneri e Vanara (2008) avaliaram a influência de diferentes doses (100, 200, 300 e 400 Kg/ha) e fontes de nitrogênio (uréia e fertilizante de liberação lenta) na ocorrência de micotoxinas em safras de 2000, 2001 e 2002. Os resultados demonstraram que mais de 80% da contaminação por fumonisinas ocorreu em situações de

deficiência de nitrogênio. Entretanto, doses muito elevadas de fertilizante nitrogenado também favoreceram a contaminação por fumonisinas. Portanto, uma aplicação balanceada de fertilizante nitrogenado seria a melhor solução para prevenir a contaminação de grãos de milho por fumonisinas.

Hassegawa *et al.* (2008) analisaram os efeitos da aplicação de diferentes doses de nitrogênio (0, 50 e 100 kg/ha), zinco (0, 0,5 e 1,0 kg/ha) e boro (0 e 0,5 kg/ha) na contaminação fúngica e na produção de fumonisinas em amostras de milho da safra de 2000. Sob as condições do experimento, um aumento na concentração de zinco resultou em um aumento da frequência relativa de *F. verticillioides* e produção de FB₂, porém levou a uma diminuição na frequência relativa de *Penicillium* spp. A combinação de nitrogênio (100 kg/ha) com zinco (0 e 1,0 kg/ha) e boro (0 e 0,5 kg/ha) resultou na redução das concentrações de FB₁ e FB₂. Portanto, existe a necessidade da utilização cuidadosa dos macronutrientes e, especialmente, de micronutrientes, não só para aumentar a produtividade do milho, mas como uma medida de controle de fungos e micotoxinas.

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

A fertilização nitrogenada, em geral, mostra-se como um fator de extrema importância para a contaminação por fumonisinas em grãos de milho, podendo ser utilizada para diminuir os riscos de contaminação por micotoxinas. Ressalta-se, no entanto, que além da concentração, a fonte de nitrogênio parece estar correlacionada à produção de micotoxinas em milho, e deve ser também explorada a fim de minimizar a ocorrência dessas toxinas e dos fungos que as produzem, proporcionando maior segurança alimentar (BLANDINO, REYNERI e VANARA, 2008; HASSEGAWA *et al.*, 2008).

3.5 AFLATOXINAS

As aflatoxinas, grupo de micotoxinas mais estudado (mais de 5000 publicações) (RAMOS e HERNÁNDEZ, 1997), constituem um grupo de metabólitos heterocíclicos (COLE e COX, 1981), derivados de bisfuranocumarinas polissubstituídas (GOTO, WICKLOW e ITO, 1996; RAMOS e HERNÁNDEZ, 1997; BENNETT e KLICH, 2003; SHI *et al.*, 2006). São produzidas pela via das policetidas por muitas cepas de *Aspergillus flavus* Link e *A. parasiticus* Speare (RAMOS e HERNÁNDEZ, 1997; BENNETT e KLICH, 2003). *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus*, *A. nomius* e *A. tamarisii* são também espécies produtoras de aflatoxinas, mas encontrados em menor frequência (GOTO, WICKLOW e ITO, 1996).

A incidência de aflatoxinas é relativamente maior em países de clima tropical ou subtropical, onde a temperatura e a umidade são favoráveis para o crescimento de fungos (MOSS, 1996).

Muitos substratos são suscetíveis à contaminação por fungos toxigênicos produtores de aflatoxinas, tendo sido detectadas em diversos gêneros alimentícios de muitas partes do mundo, mas a maior contaminação ocorre em milho, amendoim e castanhas. São, atualmente, consideradas como um dos mais perigosos contaminantes de alimentos (LOPEZ-GARCIA, PARK e PHILLIPS, 1999; BENNETT e KLICH, 2003).

Ao menos 18 aflatoxinas diferentes foram identificadas, incluindo AFB₁, B₂, G₁, G₂, B_{2a}, G_{2a}, M₁, M₂, P₁, Q₁, aflatoxicol A, B e D₁, das quais somente as quatro primeiras ocorrem naturalmente (Figura 7); as outras são produtos metabólicos de origem animal ou microbiano (ALY, ABDEL-GALIL e ABDEL-WAHHAB, 2004). AFB₁ (Figura 8) é a mais potente substância carcinogênica (SQUIRE, 1981), sendo classificada pelo IARC como carcinógeno do grupo 1 (IARC, 1993).

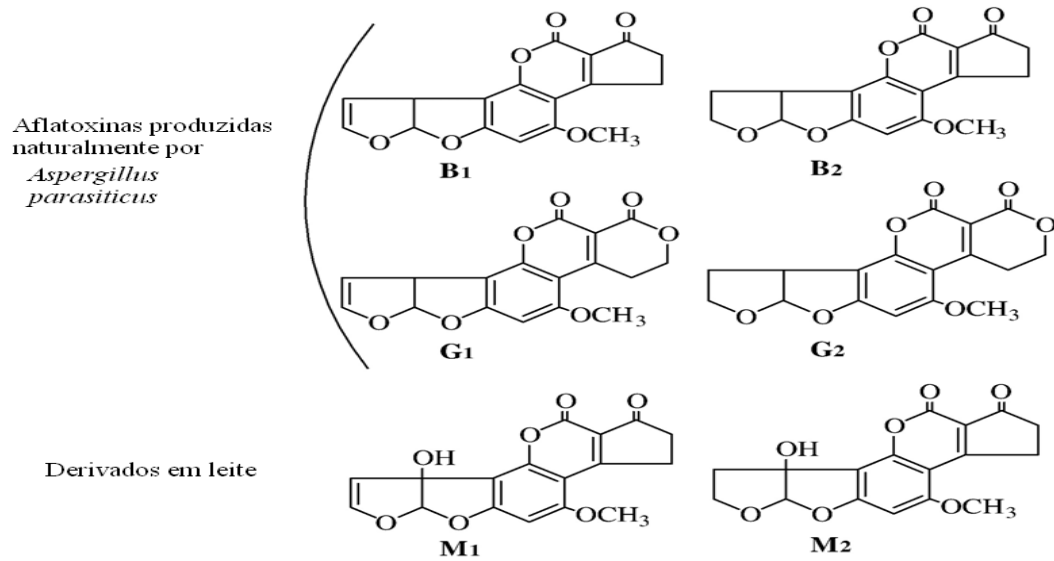


Figura 7 – Estruturas químicas das aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ e M₂.
Fonte: Adaptado de Jaynes; Zartman e Hudnall (2007).

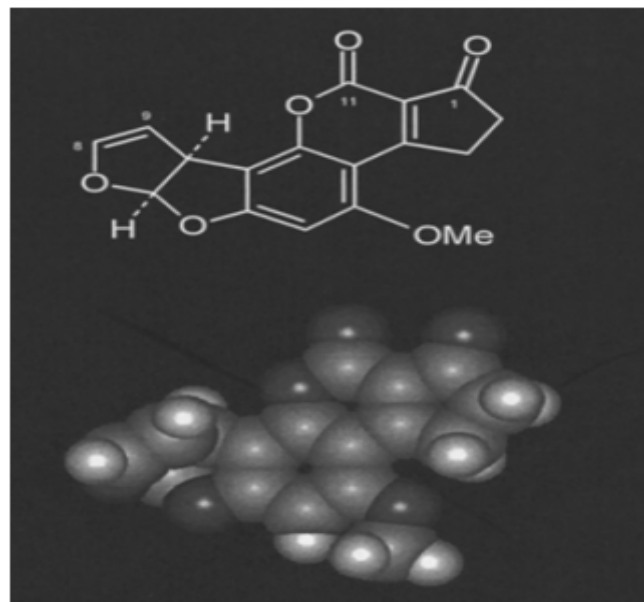


Figura 8 – Estrutura química e modelo molecular da aflatoxina B₁.
Fonte: Phillips (1999).

3.5.1 Via de Biossíntese

A via de biossíntese de aflatoxinas (Figura 9) tem sido descrita em muitos estudos (SWEENEY e DOBSON, 1998). Primeiramente, acetato e malonil-CoA são

convertidos a hexanoil pela ácido graxo sintase, que posteriormente é transformado a ácido norsolorínico decacetida pela policetida sintase, o primeiro precursor estável na biossíntese de aflatoxinas. A policetida sofre então aproximadamente 12 a 17 transformações enzimáticas, por meio de uma série de vias intermediárias, incluindo averantina, 5'-hidroxiaverantina, averufanina, averufina, 1'-hidroxiversicolorona, versiconal acetato, versiconal e versicolorina B. A via então divide-se para formar AFB₁ e AFG₁, que contêm anéis diidrobisfurano e são produzidos a partir de dimetilesterigmatocistina (DMST), e AFB₂ e AFG₂, que contêm anéis tetraidrobisfurano e são produzidos a partir de dihidrodimetilesterigmatocistina (DHDMSM) (MAGGON, GUPTA e VENKITASUBRAMANIAN, 1977; YABE *et al.*, 1998; SWEENEY e DOBSON, 1998).

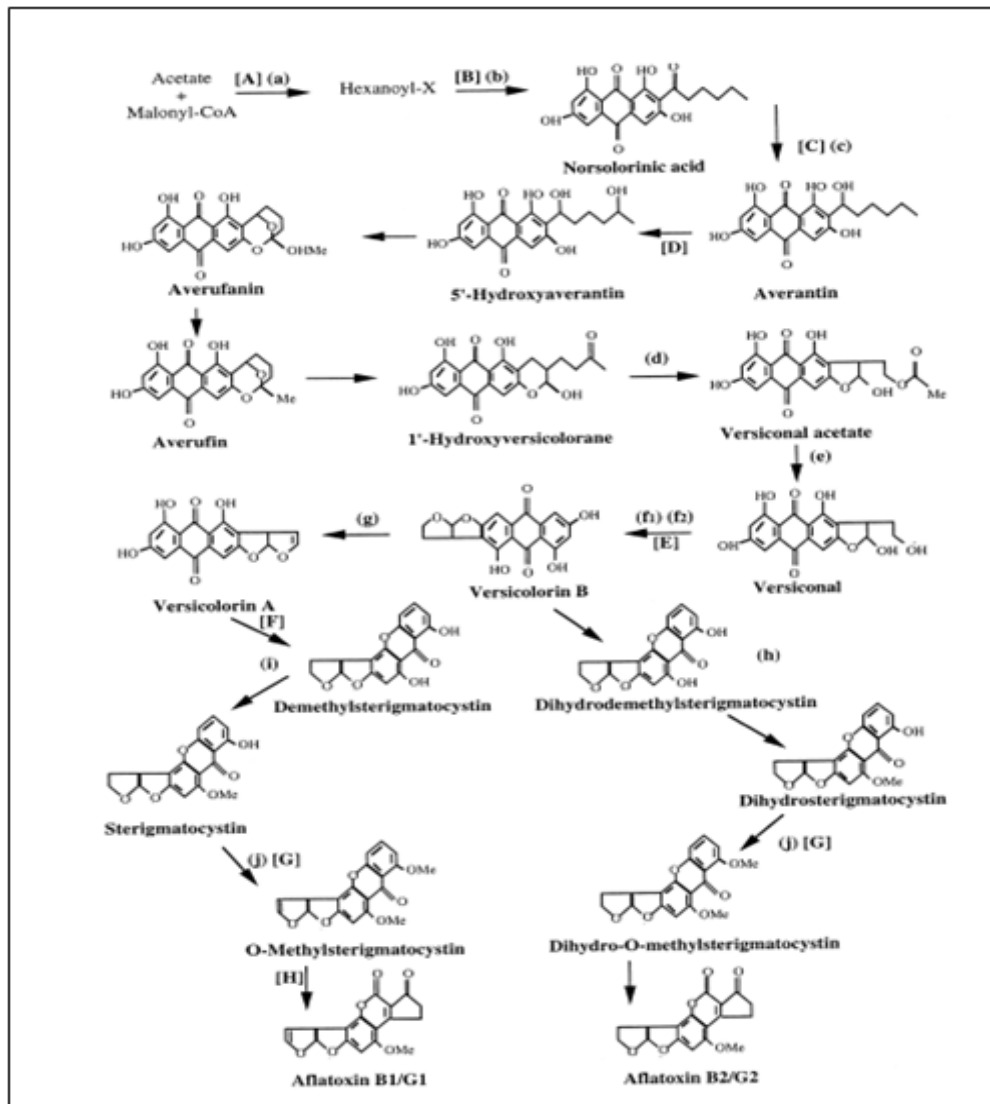


Figura 9 – Via de biossíntese de aflatoxinas.
Fonte: Sweeney e Dobson (1998).

3.5.2 Características Físicas e Químicas

As aflatoxinas são compostos de natureza cristalina, com coloração amarelo claro a incolor, pouco solúveis em água (10-30 µg/mL), moderadamente solúveis em solventes orgânicos polares, como clorofórmio e metanol, e particularmente em dimetil sulfóxido (COLE e COX, 1981). São termoestáveis (IARC, 2002), instáveis na presença de agentes oxidantes e em pH extremos (< 3, > 10) e são degradadas na presença de soluções fortemente alcalinas, como amônia e hipoclorito de sódio (WOGAN, 1966; IARC, 2002).

A Tabela 1 apresenta as principais características físico-químicas das aflatoxinas de maior importância.

AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ são distinguidos por suas propriedades fluorescentes sob luz ultravioleta e, por isso, são representadas pelas letras B (blue – azul) e G (green – verde). Os índices 1 e 2 referem-se às suas mobilidades cromatográficas (BENNETT e KLICH, 2003).

Tabela 1 – Características físico-químicas das principais aflatoxinas.

<u>Aflatoxina</u>	<u>Fórmula química</u>	<u>Massa molecular</u>	<u>Temperatura de fusão (°C)</u>	<u>Emissão de fluorescência (nm) e cor*</u>
AFB ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	269	425-azul
AFB ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	425-azul
AFG ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	450-verde
AFG ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	450-verde
AFM ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	425-violeta azulada
AFM ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	425-violeta

* Fluorescência sob luz ultravioleta.

Fonte: Adaptado de Wogan (1966).

Os principais efeitos biológicos das aflatoxinas são carcinogenicidade, imunossupressão, mutagenicidade e teratogenicidade (BETINA, 1989). O órgão alvo principal da toxicidade e carcinogenicidade em seres humanos e animais é o fígado, onde ocorre a metabolização da toxina pelo citocromo P450, formando um metabólito altamente reativo, AFB₁- 8,9- epóxido (NEAL *et al.*, 1998; GIRAY *et al.*, 2007). Os efeitos metabólicos das aflatoxinas incluem inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas, redução da atividade

de diversas enzimas, supressão do metabolismo da glicose; inibição da síntese de lipídios, incluindo o de fosfolipídios, ácidos graxos livres, triglicerídeos e colesterol e seus ésteres (BETINA, 1989).

Face ao perigo que constitui a presença de aflatoxinas em alimentos destinados ao consumo humano e animal, torna-se necessário estabelecer os seus limites máximos permitidos. A definição de uma dose sem efeito cancerígeno a partir dos dados obtidos desde há muito em animais é difícil. Tem havido uma grande evolução no que se refere aos teores de aflatoxina admissíveis em produtos para alimentação humana e animal. Esses limites têm diminuído na razão direta do aumento da sensibilidade dos métodos de análise e do conhecimento dos efeitos das aflatoxinas nos organismos. O estabelecimento desses limites é de maior importância, na medida em que vai criar dificuldades de comercialização de produtos contaminados acima de determinado limite (AMADO, 1999).

Cada país estabelece os níveis máximos tolerados de aflatoxinas, sendo que na Tabela 2 estão apresentados os valores admissíveis de ingestão no Brasil, União Européia e Japão.

De acordo com a legislação brasileira, o Ministério da Saúde, na Resolução RDC nº. 274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002, publicado no Diário Oficial da União, de 16 de outubro de 2002, estabelece o limite máximo permitido de 20 µg/kg para a somatória de aflatoxinas (B₁+B₂+G₁+G₂) em grãos de milho inteiro, partido, amassado, moído, farinhas e sêmolos (ANVISA, 2007).

Tabela 2 – Limites máximos tolerados para aflatoxinas em alguns países.

Valores admissíveis de ingestão de Aflatoxinas				
		Brasil	União Européia	Japão
AFB₁	Humano	30 µg/kg ^{1*}	2 µg/kg	10 µg/kg
			8 µg/kg ^{2*}	
			5 µg/kg ^{3*}	
			2 µg/kg ^{4*}	
	Animal		10 µg/kg	1000 µg/kg
AF Total	Humano	20 µg/kg	4 µg/kg	
			15 µg/kg ^{2*}	
			10 µg/kg ^{3*}	
			4 µg/kg ^{4*}	
	Animal	50 µg/kg	50 µg/kg	

^{1*} Aflatoxinas B₁ + G₁.

^{2*} Para amendoim a ser submetido à seleção ou outro tratamento físico.

^{3*} Para nozes e frutas secas a serem submetidas à seleção ou outro tratamento físico.

^{4*} Para cereais e produtos processados para consumo direto ou como ingrediente para alimentos

AF Total: somatório das aflatoxinas B₁ + B₂ + G₁ + G₂.

Fonte: Disponível em: <www.micotoxinas.com.br> Acesso em 11 Março 2010.

3.6 CONTROLE DE MICOTOXINAS

Devido à comprovada natureza tóxica das micotoxinas, existe a necessidade de prevenir a contaminação de alimentos por fungos toxigênicos e controlar o crescimento fúngico mediante a manipulação do microambiente em que se encontra o alimento (MALLMANN *et al.*, 2006). Métodos de controle são utilizados para que a redução da concentração de micotoxinas esteja em níveis seguros, ou a utilização de produtos de degradação não tóxicos, sem que esses processos promovam a diminuição do valor nutritivo dos alimentos descontaminados (MALLMANN *et al.*, 2006; WATTS *et al.*, 2003).

Os métodos para controle de micotoxinas podem ser classificados em duas categorias principais (MALLMANN *et al.*, 2006):

- Prevenção da contaminação e do crescimento fúngico;
- Detoxificação dos compostos tóxicos produzidos por fungos.

A contaminação por micotoxinas requer um controle efetivo e estratégias integradas. A fim de evitar perdas causadas por contaminação com micotoxinas, muitas estratégias têm sido investigadas (RAMOS e HERNANDEZ, 1997; KUBENA *et al.*, 1998; JOUANY, YIANNIKOURIS e BERTIN, 2005). O crescimento do fungo e a produção de micotoxinas podem ser controlados no campo empregando-se práticas agrícolas apropriadas, como sementes de qualidade isentas de fungos, impedindo o ataque de insetos e a enfermidade de plantas. A utilização de híbridos resistentes a fungos ou danos, tanto mecânico quanto causado por insetos, também representam uma excelente possibilidade de redução da contaminação fúngica.

Durante o processo de colheita, deve-se evitar o dano mecânico, que está invariavelmente associado a uma rápida invasão de fungos. Outros fatores no processo de colheita são a limpeza dos cereais, pois os resíduos que ficam aderidos ou misturados normalmente são portadores de espécies fúngicas toxigênicas, e a implantação de boas práticas de armazenamento e boas condições ambientais que impeçam a contaminação fúngica (HUWIG *et al.*, 2001; CAST, 2003; JOUANY, YIANNIKOURIS e BERTIN, 2005; MALLMANN *et al.*, 2006).

3.7 MÉTODOS DE DESCONTAMINAÇÃO

Inúmeras estratégias, que incluem métodos físicos, químicos e biológicos, tais como separação física, inativação térmica, irradiação γ , degradação microbiana e tratamento com uma variedade de substâncias químicas, têm sido utilizadas para a detoxificação ou inativação de micotoxinas em alimentos contaminados (KUBENA *et al.*, 1998; LEDOUX *et al.*, 1999; IBRAHIM, SHAREEF e AL-JOUBORY, 2000; EL-NEZAMI *et al.*, 2004; YE, LV e ZHOU, 2009), contudo, muitos desses métodos são impraticáveis ou potencialmente inseguros devido à formação de resíduos tóxicos ou alteração do conteúdo de nutrientes, sabor ou odor do produto (KUBENA *et al.*, 1998).

Os métodos biológicos incluem processos de fermentação com microrganismos; as conversões, contudo, são geralmente lentas e incompletas (SWEENEY e DOBSON, 1998; BATA e LÁSZTITY, 1999). Algumas micotoxinas podem ser degradadas por meio de substâncias químicas, como o ozônio ou amônia, porém, podem deteriorar e deixar resíduos no alimento (HUWIG *et al.*, 2001).

Uma das estratégias promissoras para solucionar o problema de contaminação de rações com micotoxinas é baseada na utilização de materiais adsorventes não-nutritivos, limitando, assim, sua absorção no trato gastrointestinal dos animais (RAMOS e HERNÁNDEZ, 1996; GRANT e PHILLIPS, 1998; HUWIG *et al.*, 2001; YIANNIKOURIS *et al.*, 2003; SHI *et al.*, 2006).

Conhecidos como adsorventes de micotoxina ou agentes ligantes, os aditivos especiais para ração constituem a abordagem mais comumente utilizada para prevenir e tratar micotoxicoses em animais. Acredita-se que os agentes se ligam à micotoxina, impedindo que sejam absorvidas, sendo excretados pelas fezes.

3.7.1 Utilização de Adsorventes

O nível efetivo de inclusão dos adsorventes de micotoxina na dieta dependerá da capacidade de ligação do adsorvente à micotoxina e do grau de contaminação da ração em questão. O sistema ideal para detoxificar as rações animais deve levar em consideração não somente a redução de micotoxinas, mas também que a substância

empregada não libere produtos de degradação tóxicos nem reduza o valor nutritivo dos alimentos tratados. Com o crescente problema da contaminação por micotoxinas, a adição de compostos adsorventes nutricionalmente inertes na dieta tem sido uma importante ferramenta (MALLMANN *et al.*, 2006).

Do ponto de vista técnico, os resultados de avaliações *in vitro* e *in vivo* são considerados para que um produto seja selecionado como adsorvente de micotoxinas. Contudo, para que um produto seja liberado para comercialização no Brasil, este deve ser devidamente registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Segundo Ramos e Hernández (1996), um bom adsorvente deve possuir alta afinidade pela micotoxina, resultando na formação de um complexo estável com baixo risco de dissociação.

As principais características de um adsorvente devem ser (LOPEZ-GARCIA, PARK e PHILLIPS, 1999; MALLMANN *et al.*, 2006):

- Taxa de inclusão baixa e efetiva;
- Estabilidade em uma ampla faixa de pH (isto é necessário para que a micotoxina permaneça ligada ao adsorvente em todo o trato gastrointestinal e seja excretada);
- Alta afinidade para adsorver baixas concentrações de micotoxinas;
- Alta capacidade para adsorver altas concentrações de micotoxinas;
- Capacidade de agir rapidamente antes que a micotoxina possa ser absorvida pela corrente sanguínea;
- O alimento ou ração animal deve permanecer com seu valor nutricional e palatabilidade;
- As propriedades físicas das matérias-primas não devem sofrer alterações significativas;
- Deve ser economicamente viável (o custo de descontaminação deve ser inferior ao valor do produto contaminado).

A eficácia da ligação de micotoxinas é dependente da estrutura cristalina e das propriedades físicas do adsorvente, bem como das propriedades físicas e químicas das micotoxinas (FILIPPIDIS *et al.*, 1996). As propriedades físicas das micotoxinas, como polaridade, solubilidade, tamanho, forma, e no caso de compostos ionizáveis, distribuição de

carga e constantes de dissociação, desempenham um papel significativo nos processos de adsorção (HUWIG *et al.*, 2001). Devido as micotoxinas serem compostos orgânicos complexos contendo diferentes grupos funcionais (IARC, 1993), sua adsorção pode variar com o pH da solução (HUWIG *et al.*, 2001).

3.7.2 Tipos de Adsorventes

Os adsorventes podem ser inorgânicos ou orgânicos, dependendo de sua estrutura física, isto é, a carga total e a distribuição de cargas. Os adsorventes inorgânicos mais usados (Tabela 3) são zeólitas, bentonitas, argilas, aluminossilicato de sódio e cálcio hidratado (HSCAS), montimorilonita, terra diatomácea, clinoptilolita e sepiolita (PHILLIPS *et al.*, 1988; RAMOS e HERNÁNDEZ, 1996; HUWIG *et al.*, 2001; PAPAIOANNOU *et al.*, 2005). Os orgânicos (Tabela 4) incluem extrato de parede celular de levedura, levedura, colestiramina e crospovidona (BATA e LÁSZTITY, 1999; RAMOS e HERNÁNDEZ, 1996; AVANTAGGIATO, HAVENAAR e VISCONTI, 2003).

Tabela 3 – Adsorção *in vitro* de micotoxinas por diferentes adsorventes inorgânicos.

Adsorventes	Micotoxinas	Capacidade de adsorção (mg/g)	Referências
Carvão ativado	AFLA	10,0	DECKER e CORBY, 1980.
Carvão ativado	AFLA/FUM	120/11,0	GALVANO <i>et al.</i> , 1997.
HSCAS	AFLA	86,0	PHILLIPS <i>et al.</i> , 1988.
Montimorilonita	AFLA	1,9	RAMOS e HERNÁNDEZ, 1996.
Filosilicatos, Bentonita	AFLA/OTA/ ZEA	0,03-0,44	SCHALL <i>et al.</i> , 2000.
Montimorilonita	ZEA	0,19	RAMOS <i>et al.</i> , 1996.
Bentonita		0,11	
Sepiolita		0,07	
Trisilicato de Mg		0,02	

AFLA = Aflatoxina FUM = Fumonisina OTA = Ocratoxina A ZEA = zearalenona

Fonte: Adaptado de HUWIG *et al.*, 2001.

Tabela 4 – Adsorção *in vitro* de micotoxinas por diferentes adsorventes orgânicos.

Adsorventes	Micotoxinas	Capacidade de adsorção (mg/g)	Referências
Levedura	OTA	1,2-8,6	BAUER, 1994.
Extrato de parede celular de levedura (Mycosorb™)	ZEA	2,7	VÖLKL e KARLOVSKY, 1998.
Extrato de parede celular modificada	AFLA/OTA/ ZEA/TRI	0,2-1,9	HOWES e NEWMAN, 2000.
Colestiramina	ZEA	> 0,3	RAMOS <i>et al.</i> , 1996.
Crospovidona		0,3	

AFLA = Aflatoxina TRI = Tricotecenos OTA = Ocratoxina A ZEA = zearalenona

Fonte: Adaptado de HUWIG *et al.*, 2001.

Os aluminossilicatos (zeólitas naturais, clinoptilolita e bentonitas naturais, montimorilonita) são os adsorventes mais usados (PAPAIOANNOU *et al.*, 2005).

Existem disponíveis no mercado diferentes tipos de adsorventes, inorgânicos e orgânicos, cada qual com sua especificidade (LOPEZ-GARCIA, PARK e PHILLIPS, 1999; MALLMANN *et al.*, 2006). Abaixo são citados alguns:

- TOXISORB® é um produto organicamente ativado baseado em HSCAS natural, com destacada capacidade de adsorção para micotoxinas polares e não polares, testado *in vitro* e *in vivo*. Concentração de toxina: aflatoxina B₁, ocratoxina, toxina T-2: 300 ppb. Desoxinivalenol, fumonisina B₁: 1500 ppb.
- BIONIT® é um HSCAS natural, com destacada capacidade de adsorção de aflatoxinas, testado *in vitro* e *in vivo*.
- MYCO-AD® é uma argila dipolar que pode adsorver toxina T-2, que é uma micotoxina dipolar, *in vitro* e *in vivo*.
- MYCOSORB® é um adsorvente de micotoxinas à base de β-(1,3)-D-glucanas modificadas por esterificação de grupamentos. Esses carboidratos fibrosos são resistentes à degradação pelos sistemas

enzimáticos no trato digestivo do animal. Esse glucano é um material altamente organizado, composto por monômeros de glicose que formam longas cadeias, com comprimento médio de 1.500 unidades de glicose. Adsorve rapidamente zearalenona em contraste com produtos à base de argila; a adsorção ocorre nos primeiros 30 minutos. Tem 85% de capacidade total de adsorção sobre fumonisinas (DAWSON, 2002).

3.7.2.1 Aluminosilicatos (zeólitas, HSCAS, argilas)

A maioria dos estudos relacionados com a redução das micotoxicoses por meio de adsorventes está focado na utilização de aluminosilicatos, principalmente zeólitas, HSCAS (Figura 10) e aluminosilicato contendo argilas, todos consistindo de aluminatos, silicatos e alguns íons alteráveis, principalmente íons de metais alcalinos e alcalino-terrosos. Argilas minerais são camadas de silicatos com fórmula química comum $[\text{Si}_2\text{O}_5^{2-}]_{xy}$ (Figura 11), como caolin, $\text{Al}_4(\text{OH})_8\text{Si}_2\text{O}_5$. Zeólitas são compostas por tetraedros de SiO_4 e AlO_4 como blocos fundamentais de construção com o átomo de metal no centro de cada tetraedro sendo semelhantes a peneiras moleculares. HSCAS contêm íons cálcio e prótons, que são trocados naturalmente por íons sódio que ocorrem naturalmente. É um tipo de montmorilonita pertencente aos filosilicatos, que são compostos de camadas de alumínio e silício ligados em arranjos 1:1 ou 2:1 (HUWIG *et al.*, 2001).

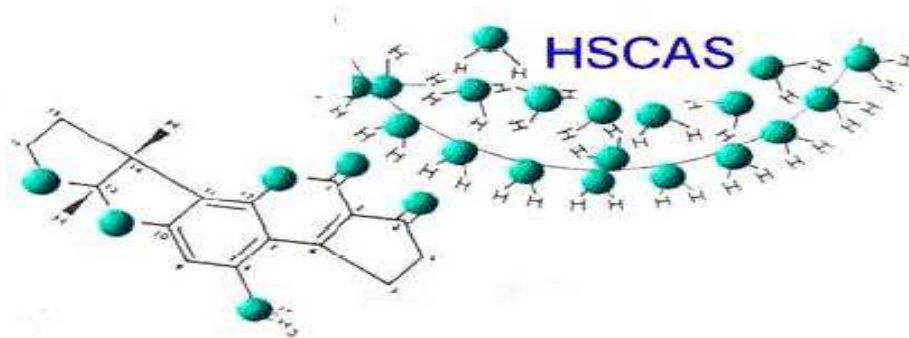


Figura 10 – Esquema ilustrando a hipótese de adsorção de aflatoxina B₁ por HSCAS por meio de ligações de hidrogênio.

Fonte: Disponível em: < www.pathport.vbi.vt.edu>. Acesso em 03 Abril 2010.

resistência mecânica da parede celular é devida a uma camada interna composta de β -D-glucanas, que consiste em um complexo β -(1,3)-D-glucanas com alto grau de polimerização, ramificado com cadeias lineares laterais β -(1,6)-D-glucanas com baixo grau de polimerização (Figura 12) (JOUANY, YIANNIKOURIS e BERTIN, 2005).

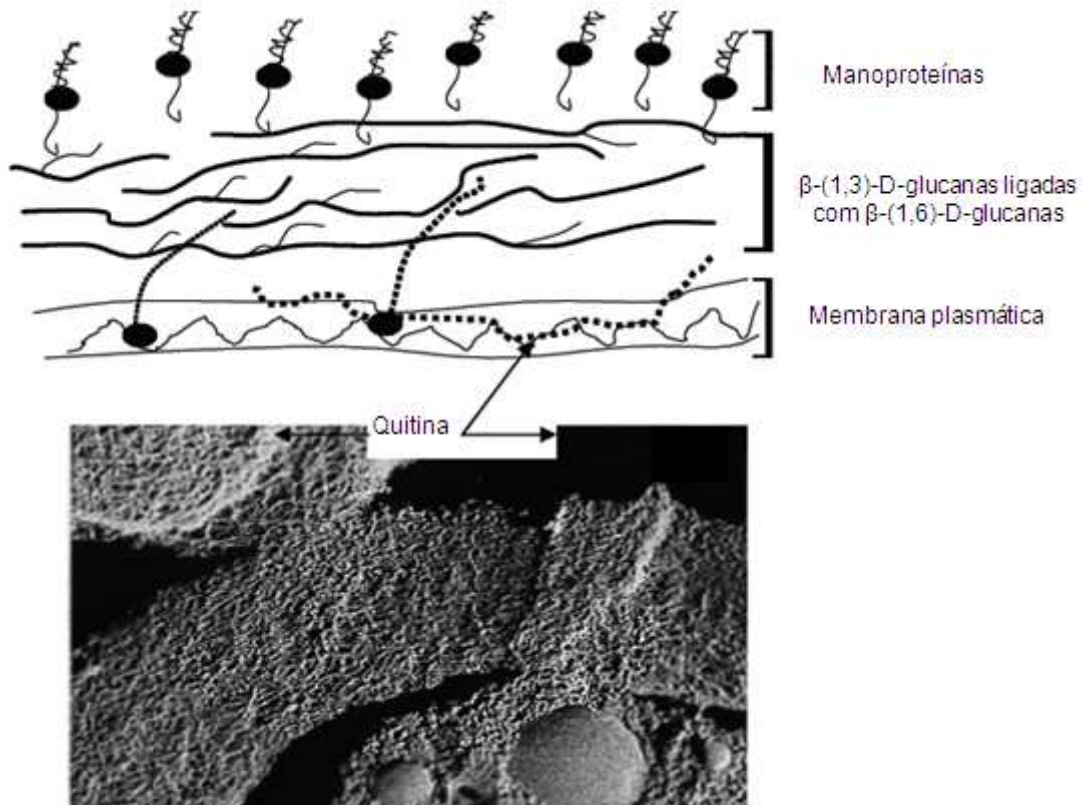


Figura 12 – Esquema da organização química da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*
Fonte: Adaptado de Jouany, Yiannikouris e Bertin (2005).

A estrutura tridimensional das β -D-glucanas é formada de espirais aleatórias ou conformações mais organizadas de várias cadeias de simples hélice, que estão agrupadas densamente em forma de tripla hélice e estabilizadas por ligações de hidrogênio inter ou intramoleculares. Esta camada interna está firmemente ligada à membrana plasmática por meio de cadeias lineares de quitina compostas de cerca de noventa unidades de N-acetilglucosamina. A quitina desempenha um papel significativo na insolubilidade da estrutura global e no empacotamento das β -D-glucanas, que influencia na plasticidade da parede celular. A camada externa da parede celular é composta de manoproteínas, que realizam funções de trocas com o meio externo. As mananas (cerca de 150 unidades de D-manose) são ligadas às β -D-glucanas.

Essa estrutura é altamente dinâmica e pode variar de acordo com a cepa da levedura, visto que aproximadamente 1200 genes conduzem à síntese desses componentes da parede celular. Condições de cultivo incluindo pH, temperatura, taxa de oxigenação, natureza do meio, e concentração ou natureza da fonte de carbono regulam pronunciadamente a quantidade e propriedades estruturais das β -D-glucanas, mananas e quitina na parede celular (JOUANY, YIANNIKOURIS e BERTIN, 2005).

Estudos têm indicado que a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* pode ser adicionada a alimentos e ração contaminados, ligando-se às micotoxinas (YIANNIKOURIS *et al.*, 2003).

Jouany, Yiannikouris e Bertin (2005), por meio de modelos matemáticos e técnicas de modelagem molecular, verificaram que a geometria da molécula da AFB₁ permite facilmente a entrada nas estruturas helicoidais das β -D-glucanas. O anel aromático, os grupos lactona e cetona da AFB₁ formam ligações polares ou eletrônicas com as unidades de glucose na simples hélice das β -D-glucanas, que mantém a toxina ligada às glucanas (JOUANY, YIANNIKOURIS e BERTIN, 2005). Ligações de hidrogênio e de van der Waals têm sido evidenciadas nos complexos glucanas-micotoxinas e são estáveis nas condições de pH ao longo do trato digestivo (YIANNIKOURIS *et al.*, 2004).

3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS

O procedimento para análise de micotoxinas geralmente consiste de três etapas: (a) amostragem; (b) preparo da amostra; (c) análise (WHITAKER, 2003).

O fato de a maioria das micotoxinas serem tóxicas em pequenas concentrações requer métodos sensíveis e confiáveis para sua detecção. Devido à variedade de estruturas desses compostos, não é possível utilizar uma técnica padrão para detectar todas as micotoxinas, cada uma irá requerer um método diferente. A aplicação de soluções mais simples, menos dispendiosas e eficazes para a detecção de micotoxinas é cada vez mais necessária devido à importância, toxicidade e exigências da legislação para os limites máximos permitidos (TURNER, SUBRAHMANYAM e PILETSKY, 2009).

Para um controle e monitoramento eficientes dos alimentos suscetíveis à contaminação, os laboratórios devem dispor de técnicas analíticas com sensibilidade, especificidade, rapidez e facilidade de uso, além de exatidão e precisão. Entretanto, a

obtenção de resultados exatos para micotoxinas não constitui uma tarefa fácil. Existem vários fatores que dificultam esse tipo de análise, como a distribuição não uniforme das micotoxinas nos lotes contaminados, as baixas concentrações (da ordem de partes por bilhão), métodos de extração e limpeza adequados. Esses passos são essenciais para o sucesso do protocolo, embora sejam demorados e afetem a escolha final do procedimento de detecção (SABINO, 1995).

Os métodos existentes para determinação de micotoxinas baseiam-se em medidas físicas ou características químicas das mesmas, como absorção na região do ultravioleta, fluorescência ou mudança de cor quando ocorre reação química (SABINO, 1995).

Os procedimentos analíticos para determinação de micotoxinas têm sido aprimorados continuamente. Os métodos cromatográficos são muito aplicados, incluindo cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG) com detecção por captura de elétrons ou massas, e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector UV, de fluorescência e acoplado a espectrômetro de massas.

A CLAE é um método bastante seletivo e sensível que permite a separação e identificação de substâncias presentes na amostra. A identificação pode ser feita comparando-se o tempo ou volume de retenção de um padrão com o da amostra (BINDER, 2007).

Existem também métodos imunológicos para detecção e quantificação de micotoxinas como ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”). Os ensaios com *kits* ELISA são favorecidos pelo pequeno volume de amostra usado e menos procedimentos de extração e pré-limpeza, comparado a métodos convencionais, como CLAE e CCD. Embora os anticorpos geralmente apresentem alta especificidade e sensibilidade, compostos com grupos químicos similares podem também interagir com os anticorpos. Esse chamado efeito matriz ou interferência da matriz comumente ocorre no ELISA, resultando em concentrações de micotoxina sub ou superestimadas nas amostras (ZHENG, RICHARD e BINDER, 2006).

A tecnologia do ELISA baseia-se na capacidade de um anticorpo específico distinguir a estrutura tridimensional de uma micotoxina específica. O ELISA competitivo direto é comumente usado na análise de micotoxinas (CHU, 1996). Uma placa de microtitulação convencional de ELISA requer um equilíbrio de reação anticorpo – antígeno que exige um tempo de incubação de cerca de 1-2 horas. Atualmente, muitos *kits* de ELISA comerciais disponíveis para detecção de micotoxinas estão baseados na fase cinética da ligação anticorpo – antígeno, o que reduz o tempo de incubação para minutos. Embora a

redução do tempo de incubação possa levar a alguma perda de sensibilidade do ensaio, o *kit* pode fornecer resultados precisos e reprodutíveis. Na Figura 13 está ilustrado o princípio do ELISA competitivo direto (ZHENG, RICHARD e BINDER, 2006).

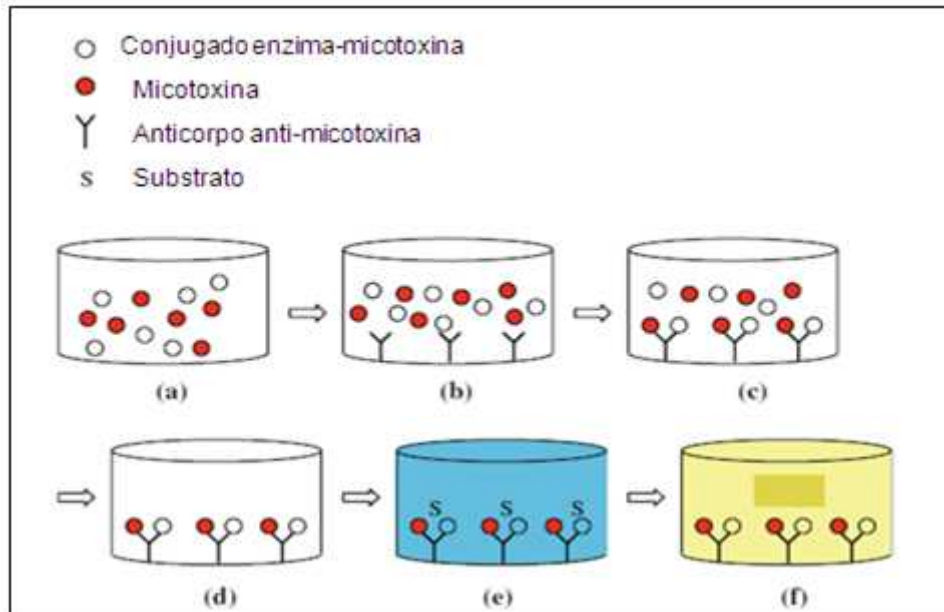


Figura 13 – Princípio do ELISA competitivo para análise de micotoxinas: (a) a amostra é misturada ao conjugado; (b) a mistura é adicionada ao anticorpo revestido; (c) as micotoxinas são ligadas ao anticorpo na primeira incubação; (d) os materiais não ligados são lavados na etapa de lavagem; (e) substrato é adicionado para o desenvolvimento de cor; (f) é adicionada solução para interromper a reação enzimática

Fonte: Adaptado de Zheng, Richard E Binder (2006).

Métodos comumente usados para purificação empregam colunas cromatográficas, extração líquido-líquido, colunas de extração em fase sólida (“Solid Phase Extraction” – SPE) e colunas de imunoafinidade. A principal vantagem no uso de colunas de imunoafinidade é que a purificação é altamente específica por meio da interação anticorpo - micotoxina, resultando em interferência mínima na cromatografia, permitindo baixos limites de detecção (BINDER, 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PADRÕES E REAGENTES

Aflatoxina B₁ cristalina foi adquirida da Acros Organics[®], com padrão de pureza 99,9%.

Fumonisin B₁ e B₂ foram adquiridas da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Todos os reagentes usados foram de grau analítico, com exceção do metanol e acetonitrila (grau HPLC).

O adsorvente para micotoxinas, composto de uma mistura na proporção de 50 % de aluminossilicato de sódio e cálcio hidratado (HSCAS) e 50% de parede celular de levedura, foi cedido pela SLO Agropecuária e Biotecnologia Ltda.

4.2 AMOSTRAS DE MILHO

4.2.1 Sistema de Plantio e Sucessão de Cultura

O híbrido de milho Pioneer 30F53 foi cultivado na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina (latossolo vermelho) semeando cinco sementes/ metro linear. As unidades experimentais constituíram-se de quatro linhas de 5m e espaçamento de 0,90m entre linhas, totalizando 20 parcelas para cada sistema de plantio. Foram avaliados os sistemas de plantio direto e convencional em sucessão a aveia e pousio no inverno na safra 2008. Também foram avaliados os efeitos da aplicação de diferentes doses de nitrogênio (N) (0; 22,5; 45,0; 67,5 e 90,0 Kg/ha) correspondente a 0, 25, 50, 75 e 100% da dose de nitrogênio em cobertura (DNC), usando-se uréia como fertilizante. A amostragem foi realizada através da coleta de 10 espigas de milho por parcela, conforme mostrado na Figura 14.

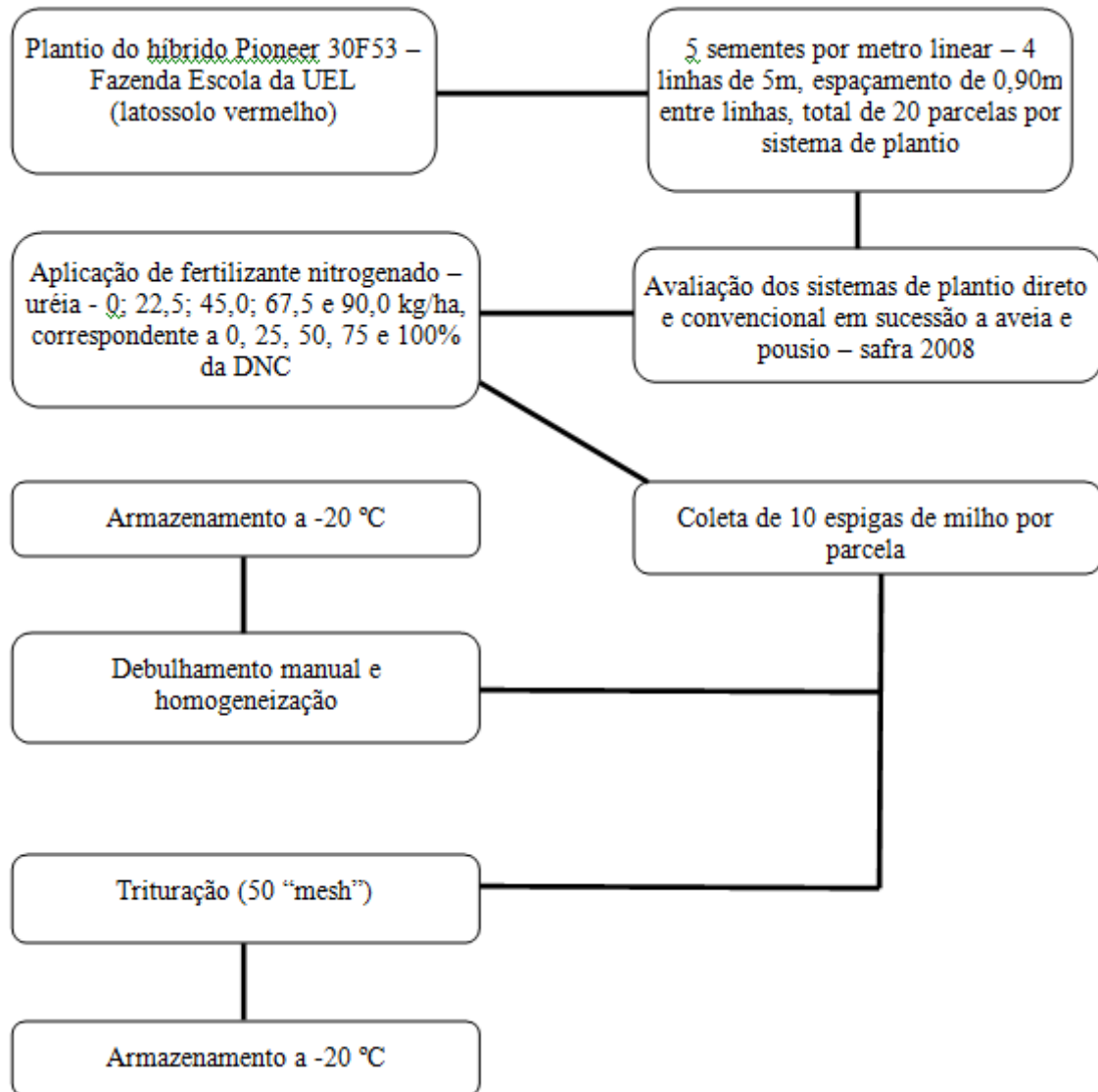


Figura 14 – Delineamento experimental para avaliação do efeito do sistema de plantio e da fertilização nitrogenada na contaminação de milho por fumonisinas.

4.2.2 Análise da Microbiota Fúngica

Uma alíquota de duzentos gramas de milho foi triturada até granulometria de 50 “mesh” e homogeneizada. 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), conforme demonstrado na Figura 15.

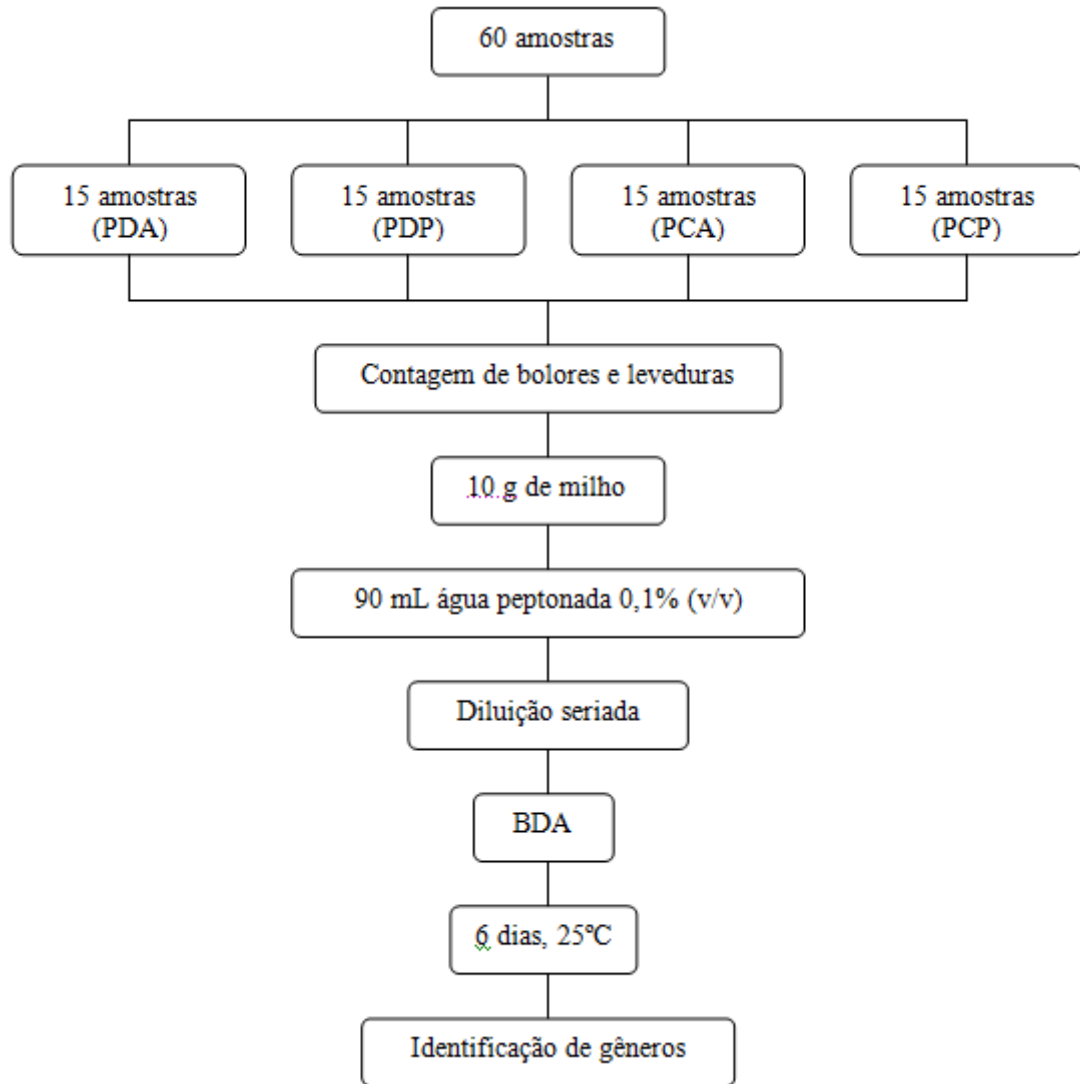


Figura 15 – Fluxograma da contagem de bolores e leveduras

PDA: plantio direto em sucessão a aveia no inverno

PCA: plantio convencional em sucessão a aveia no inverno

PDP: plantio direto em sucessão a pousio no inverno

PCP: plantio convencional em sucessão a pousio no inverno

4.3 ANÁLISE DE FUMONISINAS

4.3.1 Extração de Fumonisinas

Para extração de fumonisinas, uma alíquota de 10 g de milho triturado 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 $4500 \times g$ por 10 minutos e o sobrenadante (1 mL) 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, de acordo com a representação esquemática da Figura 16.

4.3.2 Determinação de Fumonisinas

As fumonisinas B₁ e B₂ foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, segundo o método de Shephard *et al.* (1990), modificado por Ueno *et al.* (1993) (Figura 17). A alíquota de 200 µL seca sob fluxo de nitrogênio gasoso 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-10AT, detector de fluorescência Shimadzu RF-10A XL e coluna Luna C-18 (250 x 4,6 mm, Phenomenex). 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) ajustada para pH 3,3 com ácido orto-fosfórico. O fluxo foi de 1 mL/min e temperatura de forno constante a 25 °C.

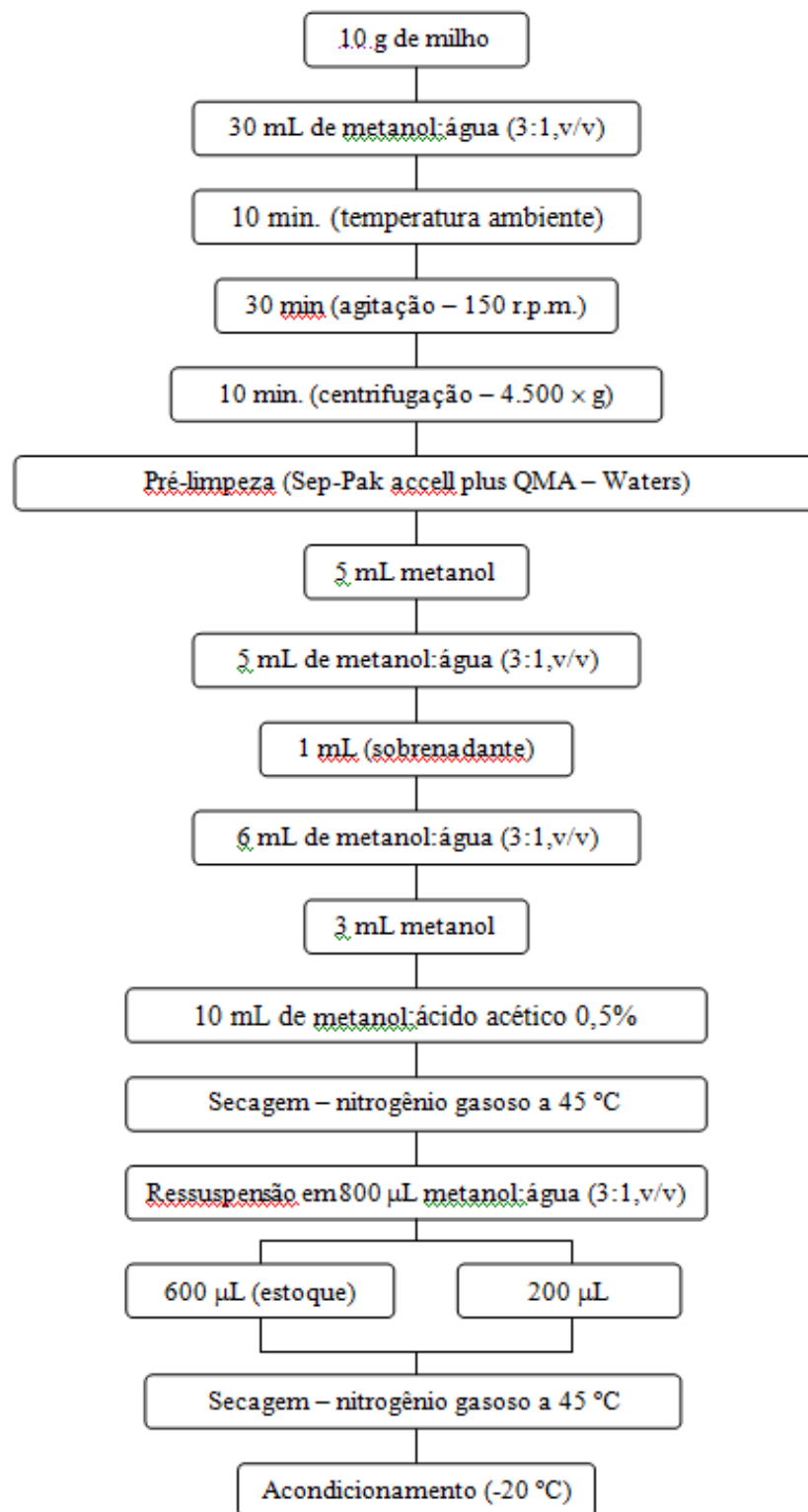


Figura 16 – Fluxograma da extração de fumonisinas.

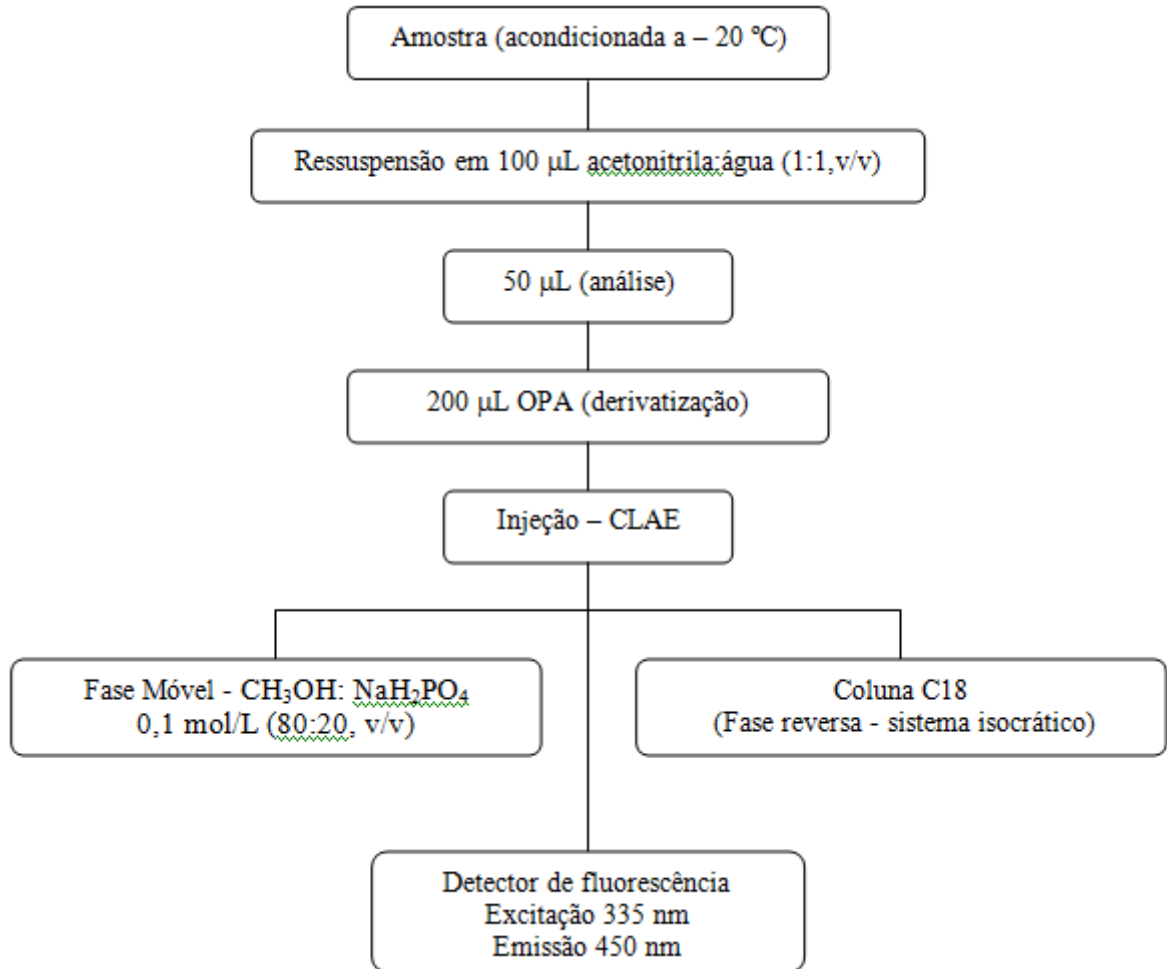


Figura 17 – Fluxograma da determinação de fumonisinas.

4.3.3 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).

4.3.4 Análise Estatística

As diferenças entre as médias da contagem de *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp., da concentração de fumonisinas e da atividade de água entre os diferentes sistemas de

plantio foram avaliadas estatisticamente utilizando ANOVA seguido pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). A correlação entre atividade de água, contagem de *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e concentração de fumonisinas foi analisada pelo Teste de correlação de Pearson ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando software Statistica 6.0 (Stat Soft, Inc.).

4.4 ANÁLISE DE AFLATOXINA B₁

4.4.1 Delineamento Experimental para a Adsorção de Aflatoxina B₁ *in vitro*

Para a triagem das variáveis foram realizados ensaios seguindo um planejamento estatístico 2^4 com quadruplicata no ponto central, resultando em 20 experimentos. Após a análise dos resultados, foi realizado outro conjunto de experimentos para a otimização dos resultados seguindo um planejamento estatístico 2^3 composto central com triplicata no ponto central, resultando em 17 experimentos.

As variáveis estudadas foram tempo de interação da toxina com o adsorvente (30, 60 e 90 minutos), porcentagem de adsorvente (0,2, 1,1 e 2%), concentração de toxina (50, 75 e 100 ng/mL) e pH (3, 5 e 7) para o planejamento estatístico 2^4 . Para o planejamento estatístico 2^3 , as condições foram tempo de interação da toxina com o adsorvente (20, 40 e 60 minutos), concentração de toxina (50, 100 e 150 ng/mL) e pH (5, 7 e 9), com quantidade de adsorvente fixa em 0,2%.

Os valores de pH foram selecionados a fim de determinar o efeito desse parâmetro sobre a adsorção de aflatoxinas na faixa encontrada no trato gastrointestinal de ruminantes e animais monogástricos.

O planejamento estatístico possibilita caracterizar um sistema sob a influência de diferentes fatores. É uma estratégia experimental baseada na variação conjunta de fatores operacionais.

4.4.4.1 Planejamento estatístico 2^4

Na Tabela 5 estão apresentados os níveis do planejamento estatístico 2^4 com quadruplicata no ponto central com as variáveis codificadas e decodificadas para avaliar o efeito da concentração da toxina, do pH, do tempo de interação da toxina com o adsorvente e da porcentagem de adsorvente sobre a adsorção de AFB₁ por 50% de HSCAS e 50% de parede celular de levedura.

Tabela 5 – Níveis do planejamento estatístico 2^4 com quadruplicata no ponto central com as variáveis codificadas e decodificadas para avaliar o efeito da concentração de AFB₁, do pH, do tempo de interação de AFB₁ com o adsorvente e da porcentagem de adsorvente sobre a adsorção de AFB₁ por 50% de HSCAS e 50% de parede celular de levedura.

Experimentos	Variáveis Codificadas				Variáveis Decodificadas			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	pH	Tempo (min.)	Adsorvente (%)	AFB ₁ (ng/mL)
1	-1	-1	-1	-1	3	30	0,20	50
2	1	-1	-1	-1	7	30	0,20	50
3	-1	1	-1	-1	3	90	0,20	50
4	1	1	-1	-1	7	90	0,20	50
5	-1	-1	1	-1	3	30	2	50
6	1	-1	1	-1	7	30	2	50
7	-1	1	1	-1	3	90	2	50
8	1	1	1	-1	7	90	2	50
9	-1	-1	-1	1	3	30	0,20	100
10	1	-1	-1	1	7	30	0,20	100
11	-1	1	-1	1	3	90	0,20	100
12	1	1	-1	1	7	90	0,20	100
13	-1	-1	1	1	3	30	2	100
14	1	-1	1	1	7	30	2	100
15	-1	1	1	1	3	90	2	100
16	1	1	1	1	7	90	2	100
17	0	0	0	0	5	60	1,10	75
18	0	0	0	0	5	60	1,10	75
19	0	0	0	0	5	60	1,10	75
20	0	0	0	0	5	60	1,10	75

4.4.4.2 Planejamento estatístico 2^3

Na Tabela 6 estão apresentados os níveis do planejamento estatístico 2^3 composto central com triplicata no ponto central com as variáveis codificadas e decodificadas para avaliar o efeito do pH, do tempo de interação de AFB₁ com o adsorvente e da concentração de AFB₁.

Tabela 6 – Níveis do planejamento estatístico 2^3 composto central com triplicata no ponto central com as variáveis codificadas e decodificadas para avaliar o efeito do pH, do tempo de interação de AFB₁ com o adsorvente e da concentração de AFB₁, com porcentagem de adsorvente fixa em 0,2%.

Experimentos	Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas		
	X ₁	X ₂	X ₃	pH	Tempo (min.)	AFB ₁ (ng/mL)
1	-1	-1	-1	5	20	50
2	1	-1	-1	9	20	50
3	-1	1	-1	5	60	50
4	1	1	-1	9	60	50
5	-1	-1	1	5	20	150
6	1	-1	1	9	20	150
7	-1	1	1	5	60	150
8	1	1	1	9	60	150
9	0	0	0	7	40	100
10	0	0	0	7	40	100
11	0	0	0	7	40	100
12	-1,68	0	0	3,64	40	100
13	1,68	0	0	10,36	40	100
14	0	-1,68	0	7	6,4	100
15	0	1,68	0	7	73,6	100
16	0	0	-1,68	7	40	16
17	0	0	1,68	7	40	184

4.4.2 Ensaio de Adsorção de AFB₁ *in vitro*

Alíquotas de adsorvente em pó (10, 55 e 100 mg) correspondentes a 0,2, 1,1 e 2% (m/v) foram adicionadas a tubos tipo Falcon de 50 mL contendo 4,5 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L (pH 3, 5 e 7) e 0,5 mL de padrão de AFB₁ em metanol (50, 75 e 100 ng/mL). Os tubos foram agitados a 250 r.p.m. por 30, 60 e 90 minutos e centrifugados a 4000 \times g, por 10 minutos a 25 °C. Controles (sem adsorvente) foram preparados simultaneamente e AFB₁ foi analisada no sobrenadante.

Após a análise dos resultados, foi realizado outro conjunto de experimentos seguindo um planejamento estatístico 2³ composto central com triplicata no ponto central.

A quantidade de 10 mg adsorvente em pó, correspondente a 0,2% (m/v), foi adicionada a tubos tipo Falcon de 50 mL, 4,5 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L (pH 5, 7 e 9) e 0,5 mL de padrão de AFB₁ em metanol (50, 100 e 150 ng/mL). Os tubos foram agitados a 250 r.p.m. por 20, 40 e 60 minutos e centrifugados a 4000 \times g, por 10 minutos a 25 °C. Controles (sem adsorvente) foram preparados simultaneamente e AFB₁ foi analisada no sobrenadante.

4.4.3 Extração de AFB₁

A extração de AFB₁ foi realizada segundo o método descrito por Soares e Rodriguez-Amaya (1989) (Figura 18). A uma alíquota de 4,0 mL do sobrenadante dos testes de adsorção, foram acrescentados 21,6 mL de metanol (CH₃OH) e 2,4 mL de cloreto de potássio (KCl) 4%, seguido de homogeneização em *shaker* por 5 minutos e filtração em papel de filtro Whatman nº 1. Uma alíquota de 14,0 mL do filtrado foi retirada e adicionada de 14,0 mL de sulfato cúprico (CuSO₄) 10% e cerca de 10 g de celite. Após homogeneização, o material foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 1 e 14,0 mL do filtrado adicionados de 14,0 mL de água destilada. A este, foram acrescentados 2,0 mL de clorofórmio, para o processo de partição. O conteúdo foi agitado por 3 minutos e após 5 minutos de decantação, foram coletados 1,5 mL, acrescentados mais 2,0 mL de clorofórmio à solução e agitados por mais 3 minutos, decantados por 5 minutos e coletados mais 1,5 mL. As duas frações de clorofórmio foram reunidas, passadas através de filtro de 0,45 μ m (Millex, Millipore[®] Durapore) e

evaporadas sob fluxo de nitrogênio em banho-maria a 45 °C. As amostras foram estocadas a -20 °C até serem analisadas.

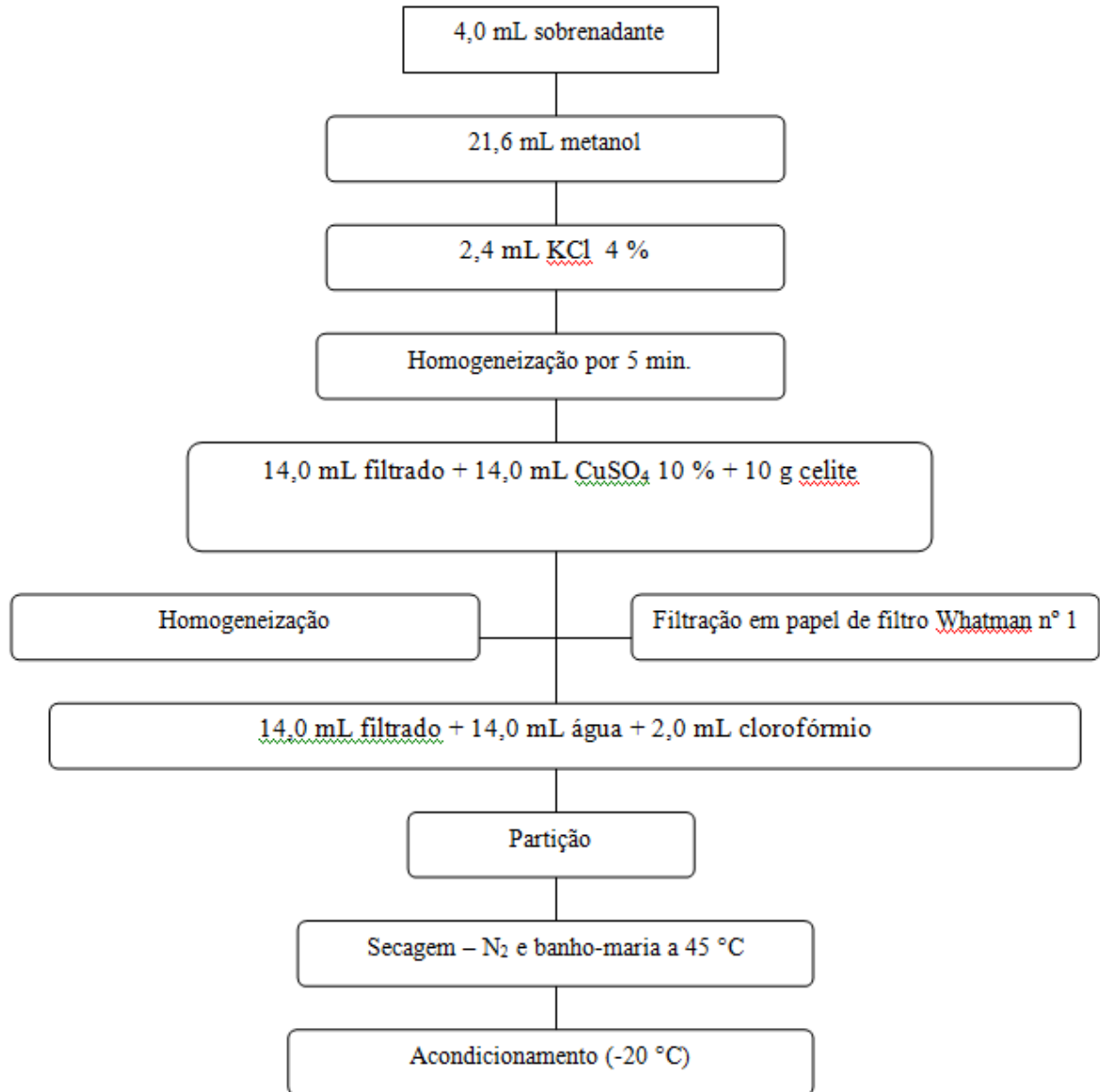


Figura 18 – Extração de aflatoxina B₁.

4.4.4 Determinação de AFB₁

As alíquotas de 3,0 mL, secas sob fluxo de N₂ em banho-maria a 45 °C foram submetidas à derivatização, segundo o método de Miyamoto, Hamada e Kawamura

(2008) (Figura 19), pela adição de 100 μL de ácido trifluoroacético (TFA), agitadas por 30 segundos, sonicadas por 5 minutos e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, na ausência de luz. TFA foi adicionado às soluções-padrão de AFs nas mesmas condições. Após o período de incubação das amostras, foram adicionados 900 μL de metanol:água (55:45, v/v) e a solução foi agitada por 15 segundos, segundo o método de Blandino, Reyneri e Vanara (2008), sendo uma alíquota de 20 μL da amostra injetados no cromatógrafo líquido de alta eficiência.

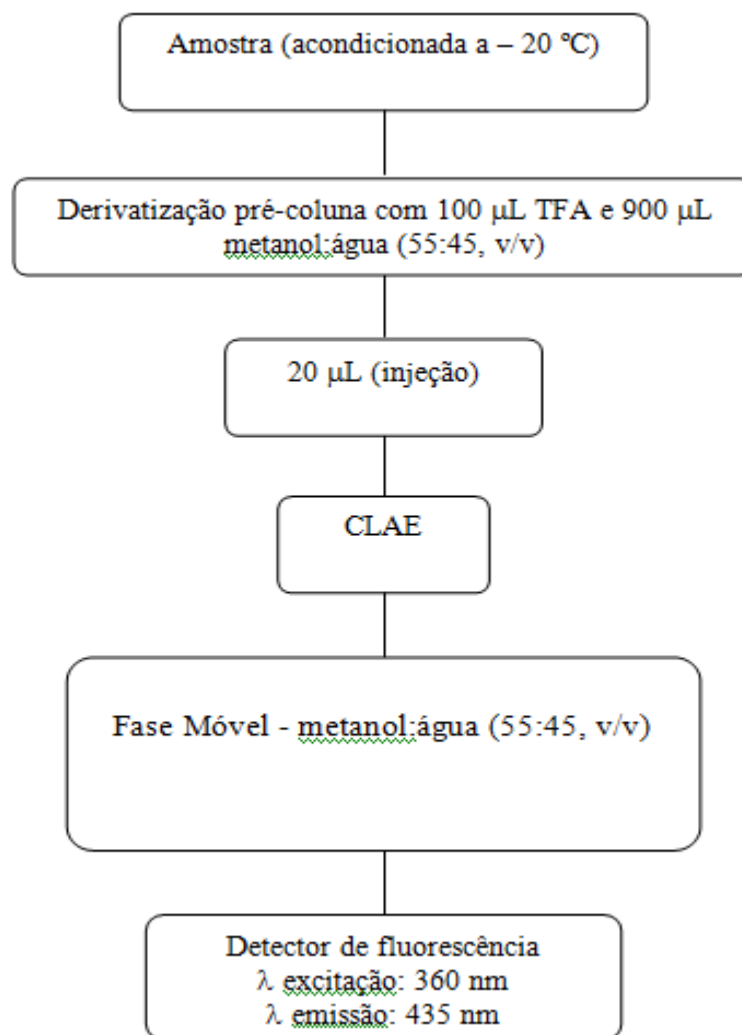


Figura 19 – Determinação de aflatoxinas.

O sistema cromatográfico consistiu de um equipamento Shimadzu (Kyoto, Japan) SCL-10AVP equipado com uma bomba LC-10AT, um injetor Rheodyne modelo 7725i

e um detector de fluorescência RF-10A XL (comprimentos de onda de excitação e emissão de 360 nm e 435 nm, respectivamente), com sistema isocrático de fase reversa. A separação foi realizada em coluna Luna C-18 Phenomenex (250 x 4,6 mm de diâmetro interno, 5 µm, Scharlau, Barcelona, Spain). A fase móvel consistiu de metanol:água (55:45, v/v) bombeada a um fluxo de 1 mL/min e a temperatura do forno constante a 25 °C.

A quantidade de AFB₁ adsorvida foi estimada pela quantidade remanescente no sobrenadante após os testes de adsorção *in vitro*.

4.4.5 Análise Estatística

Foi aplicada análise de variância ANOVA ao nível de 95% de confiança e metodologia de superfície de resposta (MSR) por meio do software Statistica 6.0 (Stat Soft, Inc.).

4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DOS ADSORVENTES

Para a microscopia de varredura, as amostras de adsorventes secas foram montadas em cilindros de metal (*stub*), recobertas com uma camada de 25 nm de ouro (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) e elétrôn-micrografadas em microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200, no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina.

4.6 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO

Para a espectroscopia de absorção no infravermelho, 0,15 g de cada amostra liofilizada de adsorvente (antes e após a adsorção de AFB₁) foi homogeneizada com 0,15 g de brometo de potássio (KBr), sendo submetidos à compactação e análise em espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier Shimadzu FTIR-8300, no Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão foram redigidos sob forma de artigos científicos a serem submetidos para publicação, os quais se encontram listados abaixo.

O Artigo A foi redigido de acordo com as normas do periódico Crop Science.

O Artigo B foi redigido de acordo com as normas do periódico International Journal of Poultry Science.

ARTIGO A

**EFEITO DO SISTEMA DE PLANTIO E DA FERTILIZAÇÃO NITROGENADA NA
CONTAMINAÇÃO DE MILHO POR FUMONISINAS**

EFEITO DO SISTEMA DE PLANTIO E DA FERTILIZAÇÃO NITROGENADA NA CONTAMINAÇÃO DE MILHO POR FUMONISINAS

Resumo

Nesse estudo foram avaliadas a contaminação fúngica natural e a contaminação por fumonisinas em 60 amostras de milho recém-colhido da região Norte do Paraná (safra 2008), sob diferentes sistemas de plantio (direto e convencional) e sucessão de culturas (aveia e pousio) no inverno. Além disso, o efeito da aplicação de fertilizante nitrogenado (0; 22,5; 45,0; 67,5 e 90,0 Kg/ha) sobre a contaminação por fumonisinas foi também avaliado. *Penicillium* spp. foi o gênero prevalente, sendo detectado em 95% das amostras, seguido de *Fusarium* spp. (78,33%) e *Aspergillus* spp. (10%). As concentrações de fumonisinas variaram de 0,26 a 3,84 µg/g, sendo as maiores médias detectadas nos sistemas de plantio convencional em sucessão a pousio e direto em sucessão a aveia, porém não diferiram significativamente dos demais sistemas de plantio pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). As médias da atividade de água dos grãos de milho variaram de 0,53 a 0,63, sendo que no sistema de plantio direto em sucessão a aveia as amostras apresentaram a maior média de a_w (0,63). A menor concentração média de fumonisinas foi detectada em milho cultivado na parcela que recebeu 67,5 Kg/ha de nitrogênio, porém não houve diferença significativa com os demais tratamentos pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados desse estudo ressaltam a importância das práticas agrícolas adequadas sobre a prevenção e redução da incidência de doenças causadas por fungos bem como na produção de fumonisinas em grãos.

Palavras-chave: Milho. Fumonisinas. Sistemas de plantio. Sucessão de culturas.

O Brasil, com uma produção anual de 51,1 milhões de toneladas, é o terceiro maior produtor de milho do mundo e o Estado do Paraná é responsável por 26,5% da produção nacional (CONAB, 2009).

Grãos de milho podem ser contaminados por uma variedade de espécies de fungos toxigênicos. A alta incidência de contaminação de milho por *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (*F. moniliforme* Sheldon) é motivo de preocupação em todo o mundo desde a descoberta das fumonisinas (Miller, 1994).

Pelo menos 28 análogos foram caracterizados e classificados em quatro principais grupos, fumonisinas das séries A, B, C e P, sendo as fumonisinas B₁ (FB₁) e B₂ (FB₂) as de maior frequência em milho e derivados (Thiel *et al.*, 1991). FB₁ é o constituinte mais tóxico e de maior ocorrência, respondendo por aproximadamente 70% do total de fumonisinas encontradas naturalmente (Rheeder *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008).

As fumonisinas causam leucoencefalomalácia em equinos, edema pulmonar e hidrotórax em suínos, efeitos hepatotóxicos e carcinogênicos e apoptose em fígado de ratos

(Shetty e Bhat, 1998; Bennett e Klich, 2003; Kumar *et al.*, 2008). Em seres humanos, há uma provável associação com câncer esofágico e foram classificadas pelo IARC (1993) como carcinógenos do grupo 2B (Rheeder *et al.*, 2002; Bennett e Klich, 2003; Kumar *et al.*, 2008).

Vários pesquisadores têm relatado alta incidência de contaminação por fumonisinas em milho e derivados nos estados brasileiros (Moreno *et al.*, 2009; Hasegawa *et al.*, 2008; Bittencourt *et al.*, 2005). Moreno *et al.* (2009) detectaram fumonisinas em 100 % das amostras de milho recém-colhido da safra 2003 da região Norte do Paraná (n = 150), onde estudos prévios demonstraram a maior contaminação por fumonisinas em milho dessa região (Hirooka *et al.*, 1996; Ono *et al.*, 2004, 2006; Silva *et al.*, 2008).

A melhor estratégia para o controle eficaz da contaminação por fumonisinas é a prevenção da infecção por *F. verticillioides* e da produção de fumonisinas no campo e durante o armazenamento de grãos.

As principais estratégias para o controle fitossanitário do milho envolvem o uso de pesticidas e da aplicação de práticas agrícolas, como plantio direto e rotação de culturas. Essa última afeta as características químicas e biológicas do solo e, portanto, a microbiota do cereal (Rothrock, 1992).

No Brasil, o milho é produzido por meio dos sistemas de plantio convencional e direto. O plantio direto é o sistema mais frequentemente utilizado, principalmente nas grandes áreas. O sistema convencional é ainda predominante entre pequenos produtores, embora seja crescente a adoção do plantio direto (CONAB, 2009). O sistema de plantio direto reduz a perda de solo, água e nutrientes por erosão em relação ao sistema de cultivo convencional, em virtude da não-desagregação do solo e da manutenção de cobertura vegetal e palha na sua superfície (Oliveira *et al.*, 2002; Beare *et al.*, 1997). Adicionalmente, a rotação de culturas envolvendo plantas leguminosas é frequentemente descrita como benéfica para o solo, fornecendo nitrogênio e fonte de carbono para a microbiota do solo de culturas posteriores, e minimizando a erosão (Drury *et al.*, 2004).

O nitrogênio é um macronutriente que desempenha importante papel na nutrição e resistência das plantas e a produtividade do milho pode ser correlacionada com a disponibilidade desse mineral (Muzilli, 1981). Uma aplicação balanceada de fertilizante nitrogenado aliada ao manejo e práticas agrícolas adequadas seria a melhor solução para prevenir a contaminação de grãos de milho por fumonisinas (Blandino *et al.*, 2008). O fornecimento de doses adequadas de nutrientes para a cultura do milho é fundamental para o desenvolvimento da planta, uma vez que a deficiência ou excesso de nutrientes essenciais podem influenciar na incidência de doenças causadas por fungos bem como na produção de

micotoxinas em grãos (Hasegawa *et al.*, 2008). Considerando a importância econômica e nutricional do milho e o número limitado de trabalhos no Brasil enfocando as práticas agrícolas e a contaminação de grãos por micotoxinas, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência de diferentes sistemas de plantio, sucessão de culturas e fertilização nitrogenada na contaminação de milho por fungos e fumonisinas.

MATERIAL E MÉTODOS

Padrões e Reagentes

Fumonisinas B₁ e B₂ foram adquiridas da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, com exceção do metanol e acetonitrila (grau HPLC).

Sistema de Plantio e Sucessão de Cultura

O híbrido de milho Pioneer 30F53 foi cultivado na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina (latossolo vermelho) semeando cinco sementes/ metro linear. As unidades experimentais constituíram-se de quatro linhas de 5 m e espaçamento de 0,90 m entre linhas, totalizando 20 parcelas para cada sistema de plantio. Foram avaliados os sistemas de plantio direto e convencional em sucessão a aveia e pousio no inverno na safra 2008. Também foram avaliados os efeitos da aplicação de diferentes doses de nitrogênio (N) (0; 22,5; 45,0; 67,5 e 90,0 Kg/ha) correspondente a 0, 25, 50, 75 e 100% da dose de nitrogênio em cobertura (DNC), usando-se uréia como fertilizante. A amostragem foi realizada através da coleta de 10 espigas de milho por parcela, homogeneizadas, totalizando 1,5 Kg.

Análise da Microbiota Fúngica

Uma alíquota de duzentos gramas de milho foi triturada até granulometria de 50 “mesh” e homogeneizada. 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).

Extração de Fumonisinias

Para extração de fumonisinias, uma alíquota de 10 g de milho triturado 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 × g por 10 minutos e o sobrenadante (1 mL) 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 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 fumonisinias.

Determinação de Fumonisinias

As fumonisinias B₁ e B₂ foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, segundo o método de Shephard *et al.* (1990), modificado por Ueno *et al.* (1993). A alíquota de 200 µL seca sob fluxo de nitrogênio gasoso 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 0,1 mol/L 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-10AT, detector de fluorescência Shimadzu RF-10A XL e coluna Luna C-18 (250 x 4,6 mm, Phenomenex). 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) ajustada 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 para FB₁ e FB₂ foram 27,5 ng/g e 35,3 ng/g, respectivamente. As taxas médias de recuperação de FB₁ e FB₂ a partir de amostras de milho artificialmente contaminadas na faixa de 100 – 400 ng/g FB₁ e 250 – 450 ng/g FB₂ foram 95,6 % e 96,9 %, respectivamente, baseando-se em duas repetições e análises em duplicata.

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).

Análise Estatística

As diferenças entre as médias da contagem de *Fusarium spp.* e *Penicillium spp.*, da concentração de fumonisinas e da atividade de água entre os diferentes sistemas de plantio foram avaliadas estatisticamente utilizando ANOVA seguido pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). A correlação entre atividade de água, contagem de *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.* e concentração de fumonisinas foi analisada pelo Teste de correlação de Pearson ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando software Statistic 6.0 (Stat Soft, Inc.).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A frequência relativa dos principais gêneros fúngicos em milho recém-colhido ($n = 60$) de campo experimental da região norte do Paraná (safra 2008) é mostrada na Figura 1.

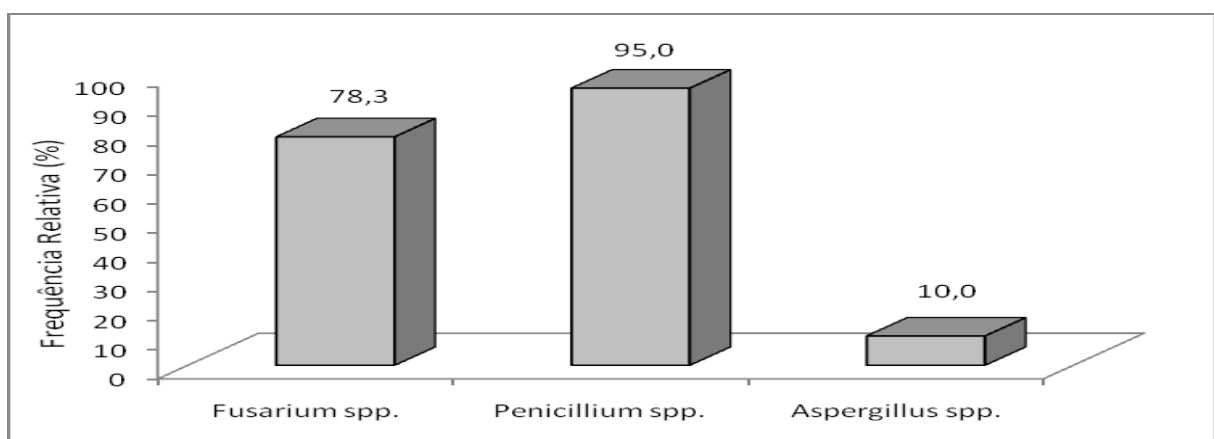


Figura 1 – Frequência relativa dos principais gêneros fúngicos em milho recém-colhido ($n = 60$) da safra 2008 da região Norte do Paraná.

Penicillium spp. e *Fusarium spp.* foram os gêneros prevalentes, sendo detectados em 95% e 78,3% das amostras, respectivamente, enquanto *Aspergillus spp.* em

10% das amostras. A alta frequência de *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp. está de acordo com os resultados de Moreno *et al.* (2009) e Ono *et al.* (2006), porém esses autores detectaram maior frequência de *Fusarium* spp. em relação a *Penicillium* spp. Moreno *et al.* (2009), analisando 150 amostras de milho (safra 2003) da região Norte do Paraná, detectaram *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. em 100 % e 97,3% das amostras, respectivamente. Ono *et al.* (2006) detectaram *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. em 100% e 91,6% das amostras de milho (n = 24) da região norte do Paraná. Almeida *et al.* (2002) analisaram 90 amostras de milho de duas regiões do Estado de São Paulo (Capão Bonito e Ribeirão Preto) e também detectaram a predominância desses gêneros fúngicos, porém em menores porcentagens. *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. foram detectados em 35% e 32% das amostras de Capão Bonito e em 49% e 21% das amostras de Ribeirão Preto, respectivamente.

A contagem total de bolores e leveduras variou de $1,0 \times 10^2$ a $4,0 \times 10^6$ UFC/g (Tabela 1). *Fusarium* spp. foram detectados na faixa de 10^2 a 10^4 UFC/g (média $1,3 \times 10^4$ UFC/g) no plantio convencional em sucessão a aveia e na faixa de 10^3 a 10^4 UFC/g (média $8,8 \times 10^3$ UFC/g) no plantio direto em sucessão a aveia, sendo a maior média ($7,9 \times 10^4$ UFC/g) no sistema de plantio direto em sucessão a pousio, no entanto, não houve diferença significativa com os demais sistemas de plantio ($p < 0,05$). A maior média de *Penicillium* spp. ($1,1 \times 10^6$ UFC/g) foi detectada no sistema de plantio direto em sucessão a aveia, diferindo significativamente dos demais sistemas de plantio ($p < 0,05$). O gênero *Aspergillus* foi detectado em somente uma amostra nos sistemas de plantio convencional em sucessão a aveia no inverno ($1,0 \times 10^2$ UFC/g) e convencional em sucessão a pousio no inverno ($1,0 \times 10^3$ UFC/g), não sendo detectado nas amostras do sistema de plantio direto em sucessão a aveia. A baixa frequência de *Aspergillus* spp. está de acordo com Marín, Sanchis e Magan (1995), que sugerem uma correlação negativa entre *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. quando são co-contaminantes em milho. Moreno *et al.* (2009), analisando 150 amostras de milho da região Norte do Paraná (safra 2003) detectaram *Aspergillus* spp. na faixa de $10^2 - 10^4$ UFC/g em amostras de recepção (n = 90), mas na faixa de $10^2 - 10^5$ UFC/g em amostras de pré-secagem (n = 60) de indústrias processadoras de milho.

Tabela 1 – Contagem de *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e bolores e leveduras em milho (n = 60) cultivado sob diferentes sistemas de plantio e sucessão de culturas na região norte do Paraná (safra 2008).

SP e SC	<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)	
	Média*	Faixa	Média*	Faixa	Média	Faixa	Média	Faixa
CA	1,3x10 ⁴ ^a	1,0x10 ² -5,0x10 ⁴	6,5x10 ⁴ ^{ab}	9,0x10 ² -4,6x10 ⁵	1,0x10 ² ^{**}	-	2,0x10 ⁴	1,0x10 ² -4,6x10 ⁵
CP	6,0x10 ⁴ ^a	4,0x10 ² -4,2x10 ⁵	7,9x10 ⁴ ^b	2,0x10 ³ -2,5x10 ⁵	1,0x10 ³ ^{**}	-	3,7x10 ⁴	4,0x10 ² -4,2x10 ⁵
DA	8,8x10 ³ ^a	1,0x10 ³ -2,0x10 ⁴	1,1x10 ⁶ ^a	2,8x10 ⁴ -4,0x10 ⁶	-	-	2,8x10 ⁵	1,0x10 ³ -4,0x10 ⁶
DP	7,9x10 ⁴ ^a	1,0x10 ³ -3,9x10 ⁵	4,6x10 ⁴ ^b	3,0x10 ³ -1,0x10 ⁵	4,0x10 ³	1,0x10 ³ -1,0x10 ⁴	3,4x10 ⁴	1,0x10 ³ -3,9x10 ⁵

SP e SC = Sistema de plantio e sucessão e culturas; CA = plantio convencional em sucessão a aveia no inverno; CP = plantio convencional em sucessão a pousio no inverno; DA = plantio direto em sucessão a aveia no inverno; DP = plantio direto em sucessão a pousio no inverno

* Médias seguidas das mesmas letras não apresentam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$)

** Detectado em somente uma amostra

Na Tabela 2 são apresentadas as concentrações de fumonisinas e atividade de água (a_w) de milho cultivado sob diferentes sistemas de plantio e sucessão de culturas (safra 2008). As concentrações de fumonisinas variaram de 0,26 a 3,84 $\mu\text{g/g}$ (média 2,43 $\mu\text{g/g}$) e de 0,95 a 3,72 $\mu\text{g/g}$ (média 2,32 $\mu\text{g/g}$) em milho cultivado sob os sistemas de plantio convencional em sucessão a pousio e direto em sucessão a aveia, respectivamente. Embora as concentrações médias de fumonisinas tenham sido maiores nesses dois sistemas de plantio, não apresentaram diferença significativa em relação aos demais sistemas de plantio pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Moreno (2008), avaliando o efeito de diferentes sistemas de plantio e sucessão de culturas (safras 2006 e 2007) em milho cultivado na região Norte do Paraná, detectou concentrações médias mais elevadas de fumonisinas, 6,97 $\mu\text{g/g}$ e 6,29 $\mu\text{g/g}$, em plantio direto em sucessão a aveia nas safras de 2006 e 2007, respectivamente.

Tabela 2 – Concentrações de fumonisinas e atividade de água (a_w) de milho cultivado sob diferentes sistemas de plantio e sucessão de cultura (safra 2008) no norte do Paraná (n = 60).

SP e SC	n	FBT ($\mu\text{g/g}$)		Atividade de Água (a_w)	
		Média*	Faixa	Média*	Faixa
CA	15	2,03 ^a	1,61-2,62	0,61 ^{ab}	0,50-0,68
CP	15	2,43 ^a	0,26-3,84	0,58 ^b	0,51-0,62
DA	15	2,32 ^a	0,95-3,72	0,63 ^a	0,57-0,67
DP	15	1,75 ^a	0,38-3,71	0,56 ^b	0,50-0,62

* Médias seguidas das mesmas letras não apresentam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$)

SP e SC = Sistema de plantio e sucessão e culturas; FBT = fumonisinas totais ($\text{FB}_1 + \text{FB}_2$); n = número de amostras; CA – plantio convencional em sucessão a aveia no inverno; CP – plantio convencional em sucessão a pousio no inverno; DA – plantio direto em sucessão a aveia no inverno; DP – plantio direto em sucessão a pousio no inverno.

As concentrações de fumonisinas (Tabela 2) foram menores que as relatadas por Ono *et al.* (2006), Abbas *et al.* (2006) e Silva *et al.* (2008). Ono *et al.* (2006) analisaram 109 amostras de milho recém-colhido do Estado do Paraná e detectaram concentrações de fumonisinas na faixa de 0,13 – 20,38 $\mu\text{g/g}$. Abbas *et al.* (2006) detectaram fumonisinas em 100% das amostras de milho (n = 65) dos Estados Unidos, em concentrações variando de 22 - 86 $\mu\text{g/g}$. Silva *et al.* (2008) analisaram 245 amostras de milho recém-colhido (safra 2004) de

indústrias processadoras de milho da região Norte do Paraná, detectando fumonisinas em 100% das amostras, com concentrações variando de 0,07 - 4,78 µg/g, 0,03 - 4,09 µg/g e 0,11 - 11,21 µg/g em amostras de campo, recepção e pré-secagem, respectivamente.

As médias da atividade de água dos grãos de milho variaram de 0,56 a 0,63 (Tabela 2), sendo que no sistema de plantio direto em sucessão a aveia, as amostras apresentaram a maior média de a_w (0,63), diferindo significativamente da a_w dos sistemas de plantio convencional e direto em sucessão a pousio. Não houve correlação significativa ($p < 0,05$) entre a_w e contagem de *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e concentração de fumonisinas. Almeida *et al.* (2002), analisando 90 amostras de milho de duas regiões do Estado de São Paulo (Capão Bonito e Ribeirão Preto), encontraram influência de a_w sobre a prevalência de *F. verticillioides*, com uma correlação negativa ($p < 0,0006$; $r = 0,44$) entre os valores de ocorrência de *F. verticillioides* e a_w em grãos de milho de Capão Bonito.

Na Tabela 3 estão apresentadas as concentrações médias de fumonisinas em milho cultivado sob sistema de plantio direto e convencional em sucessão a aveia e pousio em diferentes doses de uréia como fonte de nitrogênio.

Tabela 3 – Concentrações médias de fumonisinas em milho cultivado sob sistema de plantio direto e convencional em sucessão a aveia e pousio em diferentes doses de uréia.

Tratamento	Nitrogênio total	FB ₁ (µg/g)	FB ₂ (µg/g)	FBT* (µg/g)
	Kg/ha			
1	0	1,37	0,90	2,27 ^a
2	22,5	1,51	1,16	2,67 ^a
3	45,0	1,22	0,74	1,96 ^a
4	67,5	0,85	0,64	1,49 ^a
5	90,0	1,36	0,91	2,28 ^a

* Médias seguidas das mesmas letras não apresentam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$)
FBT = fumonisinas totais (FB₁ + FB₂)

A menor concentração média de fumonisinas (1,49 µg/g) foi detectada em milho cultivado na parcela que recebeu 67,5 Kg/ha de nitrogênio, porém não houve diferença significativa com os demais tratamentos pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Blandino, Reyneri e Vanara (2008) avaliaram a influência de diferentes doses (100, 200, 300 e 400 Kg/ha) e fontes de nitrogênio (uréia e fertilizante de liberação

lenta) na ocorrência de micotoxinas em safras de milho de 2000, 2001 e 2002 na Itália. Os resultados demonstraram que mais de 80% da contaminação por fumonisinas ocorreu em situações de estresse devido à deficiência de nitrogênio, aumentando significativamente a contaminação por FB₁ em milho. Entretanto, doses muito elevadas de fertilizante nitrogenado também favoreceram a contaminação por fumonisinas.

Hassegawa *et al.* (2008) analisaram amostras de milho recém-colhido (n = 144) do município de Piracicaba, Estado de São Paulo, e avaliaram os efeitos de doses de uréia como fonte de nitrogênio (0, 50 e 100 kg/ha) e detectaram, exceto para um tratamento, que um aumento na concentração de nitrogênio resultou na redução dos níveis de FB₁.

No Brasil, a dose recomendada de nitrogênio para ser aplicada durante a semeadura de milho para se obter o melhor rendimento é na faixa de 60 – 120 kg/ha (Coelho *et al.*, 2002). Assim, uma aplicação balanceada de fertilizante nitrogenado, aliada a outras técnicas de cultura capazes de impedir o desenvolvimento de *Fusarium* spp. constituem-se soluções para prevenir a contaminação de milho por fumonisinas (Blandino *et al.*, 2008). Os resultados desse estudo evidenciam a importância das práticas agrícolas, assim como do fornecimento de doses adequadas de nutrientes para a cultura do milho, a fim de minimizar a contaminação de grãos por fumonisinas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, Fundação Araucária, PPSUS/ Ministério da Saúde, Fundo Paraná/ SETI e CAPES pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Abbas, H.K., R.D. Cartwright, W. Xie, W.T. Shier. 2006. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. *Crop Prot.* 25 (1):1–9.
- Almeida, P.A., H. Fonseca, A.L. Fancelli, G.M. Direito, E.M. Ortega, B. Corrêa. 2002. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. *J. Agric. Food Chem.* 50 (13):3877–3882.
- Beare, M.H., S. Hu, D.C. Coleman, P.F. Hendrix. 1997. Influences of mycelial fungi on soil aggregation and organic matter storage in conventional and no-tillage soils. *Appl. Soil Ecol.* 5:211-219.
- Bennett, J.W., M. Klich. 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:497-516.
- Bittencourt, A.B.F., C.A.F. Oliveira, P. Dilkin, B. Corrêa. 2005. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. *Food Control* 16:117-120.
- Blandino, M., A. Reyneri, F. Vanara. 2008. Influence of nitrogen fertilization on mycotoxin contamination of maize kernels. *Crop Prot.* 27:222-230.
- Coelho, A. M., G.E. França, G.V.E. Pitta, V.M.C. Alves, L.C. Hernani. 2002. Cultivo do milho-Nutrição e Adubação. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Comunicado Técnico 44, Minas Gerais, Brasil: Embrapa, Sete Lagoas.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Brazilian Crop Assessment: grain. Brazilian Harvest of Grains, Second Survey. National Supply Company. Brasília: Conab, 2009.
- Drury, C.F., X.M. Yang, W.D. Reynolds, C.S. TAN. 2004. Influence of crop rotation and aggregate size on carbon dioxide production and denitrification. *Soil Tillage Res.* 79:87-100.
- Hasegawa, R.H., H. Fonseca, A.L. Fancelli, V.N. Silva, E.A. Schammass, T.A. Reis, B. Corrêa. 2008. Influence of macro- and micronutrient fertilization on fungal contamination and fumonisin production in corn grains. *Food Control* 19:36-43.
- Hirooka, E.Y., M.M. Yamaguchi, S. Aoyama, Y. Sugiura, Y. Ueno. 1996. The natural occurrence of fumonisin in Brazilian corn kernels. *Food Addit. Contam.* 13:173-183.
- International Agency for Research on Cancer - IARC. 1993. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemical to Humans. Some naturally occurring substances. Food Items and Constituents. Heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Monographs Vol. 56. Lyon: IARC:359-362.
- Kumar, V., M.S. Basu, T.P. Rajendran. 2008. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Prot.* 27:891-905.
- Marín, S., V. Sanchis, N. Magan. 1995. Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. *Can. J. Microbiol.* 41:1063-1070.

- Martins, H. M., I. Almeida, M.F. Marques, M.M. Guerra. 2008. Fumonisin and deoxynivalenol in corn-based food products in Portugal. *Food Chem. Toxicol.* 46: 2585-2587.
- Miller, J.D. Epidemiology of *Fusarium* Ear disease of Cereals. In: MILLER, J.D.; TRENHOLM, H.L. *Mycotoxins In Grain: Compounds Other Than Aflatoxin*. United States: Eagan® Press, 59-257, 1994.
- Moreno, E.C. Microbiota fúngica e micotoxinas em milho cultivado sob diferentes práticas de manejo. 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- Moreno, E.C., G.T. Garcia, M.A. Ono, E. Vizoni, O. Kawamura, E.Y. Hirooka, E.Y.S. Ono. 2009. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. *Food Chem.* 116:220-226.
- Muzilli, O. Manejo da Fertilidade do Solo. In: INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. *Plantio direto no Estado do Paraná*. Londrina: IAPAR, p.43-58. Circular n.23, 1981.
- Nelson, P.E., T.A. Tousson, W.F.O. Marasas. *Fusarium* species – An illustrated manual for identification. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, 1983.
- Oliveira, F.H.T., R.F. Novais, V.H. Alvarez, R.B. Cantarutti, N.F. Barros. 2002. Fertilidade do Solo no Sistema Plantio Direto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo, Tópicos de Ciência do Solo* 2:393-486.
- Ono, E.Y.S., M.H.P. Fungaro, S.H. Sofia, E.L.Z. Figueira, A.C. Gerage, M. Ichinoe, Y. Sugiura, Y. Ueno, E.Y. Hirooka. 2004. Trends of fumonisin contamination and animal intoxication through monitoring 1991 to 1997 corn crop in the State of Paraná, Brazil. *Mycopathologia* 158:451-455.
- Ono, E.Y.S., L. Biazon, M. Silva, E. Vizoni, Y. Sugiura, Y. Ueno, E.Y. Hirooka. 2006. Fumonisin in corn: Correlation with *Fusarium* sp. count, damaged kernels, protein and lipid content. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 49:63-71.
- Orsi, R.B., B. Corrêa, C.R. Possi, E.A. Schammass, J.R. Nogueira, S.M.C. Dias, M.A.B. Malozzi. 2000. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. *J. Stored Prod. Res.* 36:75-87.
- Rheeder, J.P., W.F. Marasas, H.F. Vismer. 2002. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2101-2105.
- Rothrock, C.S. 1992. Tillage systems and plant disease. *Soil Sci.* 154:308-315.
- Samson, R.A., E.S. Reenen-Hoeskstra, J.C. Frisvad, O. Filtenborg. *Introduction to food-borne fungi*. 4.ed. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995.
- Shephard, G.S., E.W. Sydenham, P.G. Thiel, W.C. Gelderblom. A. 1990. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liq. Chromatogr.* 13:2077-2087.
- Shetty, P.H., R.V. Bhat. 1998. Sensitive method for the detection of fumonisin B₁ in human urine. *J. Chromatogr. B* 705:171-173.

- Silva, M., G.T. Garcia, E. Vizoni, O. Kawamura, E.Y. Hirooka, E.Y.S Ono. 2008. Effect of the time interval from harvesting to the pre-drying step on natural fumonisin contamination in freshly harvested corn from the State of Paraná, Brazil. *Food Addit. Contam.* 25 (5):642-649.
- Singh, K., J.C. Frisvad, U. Thrane, S.B. Mathur. An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins. Hellerup/Denmark/: Danish Government, 1991.
- Thiel, P.G., W.F.O. Marasas, E.W. Sydenham, G.S. Shephard, W.C.A. Gelderblom, J.J. Nieuwenhuis. 1991. Survey of Fumonisin Production by *Fusarium* Species. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (4):1089-1093.
- Ueno, Y., S. Aoyama, Y. Sugiura, D.S. Wang, U.S. Lee, E.Y. Hirooka, S. Hara, T. Karki, G. Chen, S. Z. Yu. 1993. A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. *Mycotoxin Res.* 9:27-34.
- Wang, J., Y. Zhou, W. Liu, X. Zhu, L. Du, Q. Wang. 2008. Fumonisin level in corn-based food and feed from Linxian County, a high-risk area for esophageal cancer in China. *Food Chem.* 106:241-246.

ARTIGO B**AVALIAÇÃO DE ADSORVENTE INORGÂNICO E ORGÂNICO PARA
AFLATOXINA B₁ *IN VITRO***

AValiação DE ADSORVENTE INORGÂNICO E ORGÂNICO PARA AFLATOXINA B₁ *IN VITRO*

Resumo

Nesse estudo foi avaliada a eficácia da mistura de adsorventes na proporção de 50% de aluminossilicato de sódio e cálcio hidratado (HSCAS) e 50% de parede celular de levedura na adsorção de AFB₁ *in vitro* por meio de planejamentos estatísticos para analisar os efeitos das variáveis experimentais na resposta. As variáveis estudadas foram tempo de interação da toxina com o adsorvente (30, 60 e 90 minutos), porcentagem de adsorvente (0,2, 1,1 e 2%), concentração de toxina (50, 75 e 100 ng/mL) e pH (3, 5 e 7) para o planejamento fatorial 2⁴. Para o planejamento fatorial 2³, as condições foram tempo de interação da toxina com o adsorvente (20, 40 e 60 minutos), concentração de toxina (50, 100 e 150 ng/mL) e pH (5, 7 e 9), com quantidade de adsorvente fixa em 0,2%. O modelo do planejamento estatístico 2⁴ apresentou uma perda na visualização devido à variação experimental entre as variáveis, seguindo a direção do ponto máximo, sendo realizado um planejamento estatístico 2³ composto central com triplicata no ponto central, estatisticamente significativo, apresentando modelo quadrático sem falta de ajuste no nível de 95% de confiança, com a concentração de toxina como única variável significativa. Ocorreu maior adsorção de AFB₁ em pH 7 (25 ng/mg) e pH 5 (20 ng/mg). Em pH 3,64 houve adsorção de 10 ng/mg, sendo necessário um aumento na concentração de toxina para uma maior adsorção. O presente estudo mostrou que a mistura de adsorventes apresentou-se eficaz, com boa adsorção na faixa de pH entre 5 e 7.

Palavras-chave: Aflatoxina B₁. Adsorventes. Planejamento estatístico. HSCAS. Parede celular de levedura.

Introdução

As aflatoxinas (AFs) constituem um grupo de metabólitos secundários heterocíclicos sintetizados principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (Klich e Pitt, 1988). Pelo menos 18 diferentes AFs foram identificadas, incluindo AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFB_{2a}, AFG_{2a}, AFM₁, AFM₂, AFP₁, AFQ₁, aflatoxicol A, B e D₁, das quais somente as 4 primeiras são encontradas naturalmente; as demais são produtos metabólicos de origem animal ou sistemas microbianos (Cole e Cox, 1981). São compostos altamente tóxicos e carcinogênicos que causam doenças em humanos e animais e, dentre essas, AFB₁ é a mais tóxica devido a seu potencial carcinogênico, mutagênico e teratogênico (Hussein e Brasel, 2001), sendo classificada pelo IARC como carcinógeno do grupo 1 (IARC, 1993).

Os animais que consomem alimentos contaminados com AFs desenvolvem vários problemas de saúde incluindo retardo do crescimento, redução da eficiência alimentar e

danos no fígado e rins (Abbès *et al.*, 2008), além de perda de peso, aumento da mortalidade, imunossupressão e suscetibilidade a doenças infecciosas (Hinton *et al.*, 2003; Abbès *et al.*, 2008).

Alguns substratos, como cereais, sementes oleaginosas, amêndoas, especiarias e outras commodities, são suscetíveis ao crescimento de fungos aflatoxigênicos e à formação de AFs, sendo influenciados por uma série de fatores, incluindo o tipo de substrato, espécies de fungos, umidade do substrato, presença de minerais, umidade relativa do ambiente, temperatura e integridade dos grãos (Rustom, 1996), provocando grandes perdas econômicas (Shi *et al.*, 2006). A incidência de AFs em alimentos é relativamente alta em regiões tropicais e subtropicais, onde o clima quente e úmido proporciona condições ótimas para o crescimento de fungos (Rustom, 1996).

De acordo com limites máximos tolerados pela “Food and Drug Administration” (FDA), grãos para consumo humano ou animal podem conter $< 20 \mu\text{g}$ aflatoxinas/kg. Contudo, alimentos para ovinos e bovinos (exceto vacas leiteiras) podem conter até $300 \mu\text{g}$ aflatoxinas/kg. Grãos contendo $> 1000 \mu\text{g}$ aflatoxinas/kg devem ser destruídos (Jaynes *et al.*, 2007). Ruminantes, como bovinos e ovinos, são mais resistentes às micotoxinas do que a maioria dos animais, sugerindo que a população microbiana do rúmen desempenha um papel na detoxificação (Yiannikouris e Jouany, 2002).

Diferentes métodos físicos, químicos e biológicos de detoxificação têm sido empregados para minimizar os problemas relacionados às aflatoxinas (Bata e Lásztity, 1999), no entanto, a maioria desses métodos é dispendioso, demorado, impraticável ou inseguro devido à formação de resíduos tóxicos ou alteração do conteúdo de nutrientes, sabor e odor do produto. Uma das abordagens mais promissoras consiste na adição, à dieta, de materiais adsorventes não-nutritivos, que se ligam às micotoxinas e inibem a sua absorção no trato gastrointestinal de animais, reduzindo sua biodisponibilidade e toxicidade (Ramos e Hernández, 1996; Phillips, 1999).

A eficácia da adsorção depende da estrutura química do adsorvente e da micotoxina. A característica mais importante da adsorção é a estrutura física do adsorvente, isto é, carga total e distribuição de carga, tamanho dos poros e da área superficial. Por outro lado, as propriedades das moléculas adsorvato, as micotoxinas, como polaridade, solubilidade, forma e distribuição de carga, também desempenham um papel significativo nos processos de adsorção (Filippidis *et al.*, 1996; Huwig *et al.*, 2001; Avantaggiato *et al.*, 2005).

Uma variedade de adsorventes como bentonita (Rosa *et al.*, 2001), zeólita (Miazzo *et al.*, 2000), aluminossilicato de sódio e cálcio hidratado (HSCAS) (Phillips, 1999),

parede celular de levedura (Santin *et al.*, 2003; Jouany *et al.*, 2005) e carvão ativado (Denli e Okan, 2006) têm sido utilizados com sucesso na detoxificação de alimentos contaminados com AFB₁ (Ramos e Hernández, 1997), contudo, nem todos os adsorventes são igualmente eficazes na proteção contra os efeitos tóxicos das AFs e muitos interferem na composição dos nutrientes (Ledoux *et al.*, 1998).

Considerando que na maioria dos estudos com adsorventes são analisados os efeitos das variáveis experimentais separadamente, o presente estudo visou à avaliação da eficácia da mistura de HSCAS e parede celular de levedura como adsorvente de AFB₁ *in vitro* por meio de planejamentos estatísticos para analisar os efeitos das variáveis experimentais na resposta.

Material e Métodos

Padrões e Reagentes: Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, exceto metanol (grau HPLC). O adsorvente para micotoxinas, composto de uma mistura na proporção de 50% de aluminossilicato de sódio e cálcio hidratado (HSCAS) e 50% de parede celular de levedura foi cedido pela SLO Agropecuária e Biotecnologia Ltda.

Aflatoxina B₁ (AFB₁) cristalina foi adquirida da Acros Organics[®], com padrão de pureza 99,9%. Soluções-padrão estoque foram preparadas em metanol e mantidas a – 20 °C. Os padrões foram quantificados pela determinação da máxima absorvância de AFB₁ em 360 nm utilizando espectrofotômetro UV-VIS, segundo o método da AOAC (AOAC, 1990).

Delineamento Experimental para os Testes de Adsorção: Para a triagem das variáveis foram realizados ensaios seguindo um planejamento estatístico 2⁴ com quadruplicata no ponto central, resultando em 20 experimentos. Após a análise dos resultados, foi realizado outro conjunto de experimentos para a otimização dos resultados seguindo um planejamento estatístico 2³ composto central com triplicata no ponto central, resultando em 17 experimentos.

As variáveis estudadas foram tempo de interação da toxina com o adsorvente (30, 60 e 90 minutos), porcentagem de adsorvente (0,2, 1,1 e 2%), concentração de toxina (50, 75 e 100 ng/mL) e pH (3, 5 e 7) para o planejamento estatístico 2⁴. Para o planejamento estatístico 2³, as condições foram tempo de interação da toxina com o adsorvente (20, 40 e 60 minutos), concentração de toxina (50, 100 e 150 ng/mL) e pH (5, 7 e 9), com quantidade de adsorvente fixa em 0,2%.

Os valores de pH foram selecionados a fim de determinar o efeito desse parâmetro sobre a adsorção de aflatoxinas na faixa encontrada no trato gastrointestinal de ruminantes e animais monogástricos.

Planejamento Estatístico 2⁴: Na Tabela 1 estão apresentados os níveis do planejamento estatístico 2⁴ com quadruplicata no ponto central com as variáveis codificadas e decodificadas para avaliar o efeito da concentração da toxina, do pH, do tempo de interação da toxina com o adsorvente e da porcentagem de adsorvente sobre a adsorção de AFB₁ por 50% de HSCAS e 50% de parede celular de levedura.

Tabela 1 – Níveis do planejamento estatístico 2^4 com quadruplicata no ponto central com as variáveis codificadas e decodificadas para avaliar o efeito da concentração de AFB₁, do pH, do tempo de interação de AFB₁ com o adsorvente e da porcentagem de adsorvente sobre a adsorção de AFB₁ por 50% de HSCAS e 50% de parede celular de levedura.

Experimentos	Variáveis Codificadas				Variáveis Decodificadas			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	pH	Tempo (min.)	Adsorvente (%)	AFB ₁ (ng/mL)
1	-1	-1	-1	-1	3	30	0,20	50
2	1	-1	-1	-1	7	30	0,20	50
3	-1	1	-1	-1	3	90	0,20	50
4	1	1	-1	-1	7	90	0,20	50
5	-1	-1	1	-1	3	30	2	50
6	1	-1	1	-1	7	30	2	50
7	-1	1	1	-1	3	90	2	50
8	1	1	1	-1	7	90	2	50
9	-1	-1	-1	1	3	30	0,20	100
10	1	-1	-1	1	7	30	0,20	100
11	-1	1	-1	1	3	90	0,20	100
12	1	1	-1	1	7	90	0,20	100
13	-1	-1	1	1	3	30	2	100
14	1	-1	1	1	7	30	2	100
15	-1	1	1	1	3	90	2	100
16	1	1	1	1	7	90	2	100
17	0	0	0	0	5	60	1,10	75
18	0	0	0	0	5	60	1,10	75
19	0	0	0	0	5	60	1,10	75
20	0	0	0	0	5	60	1,10	75

Planejamento Estatístico 2³: Na Tabela 2 estão apresentados os níveis do planejamento estatístico 2^3 composto central com triplicata no ponto central com as variáveis codificadas e decodificadas para avaliar o efeito do pH, do tempo de interação de AFB₁ com o adsorvente e da concentração de AFB₁.

Tabela 2 – Níveis do planejamento estatístico 2^3 composto central com triplicata no ponto central com as variáveis codificadas e decodificadas para avaliar o efeito do pH, do tempo de interação de AFB₁ com o adsorvente e da concentração de AFB₁, com porcentagem de adsorvente fixa em 0,2%.

Experimentos	Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas		
	X ₁	X ₂	X ₃	pH	Tempo (min.)	AFB ₁ (ng/mL)
1	-1	-1	-1	5	20	50
2	1	-1	-1	9	20	50
3	-1	1	-1	5	60	50
4	1	1	-1	9	60	50
5	-1	-1	1	5	20	150
6	1	-1	1	9	20	150
7	-1	1	1	5	60	150
8	1	1	1	9	60	150
9	0	0	0	7	40	100
10	0	0	0	7	40	100
11	0	0	0	7	40	100
12	-1,68	0	0	3,64	40	100
13	1,68	0	0	10,36	40	100
14	0	-1,68	0	7	6,4	100
15	0	1,68	0	7	73,6	100
16	0	0	-1,68	7	40	16
17	0	0	1,68	7	40	184

Ensaio de Adsorção de AFB₁ *in vitro*: Aliquotas de adsorvente em pó (10, 55 e 100 mg) correspondentes a 0,2, 1,1 e 2% (m/v) foram adicionadas a tubos tipo Falcon de 50 mL contendo 4,5 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L (pH 3, 5 e 7) e 0,5 mL de padrão de AFB₁ em metanol (50, 75 e 100 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 adsorvente) foram preparados simultaneamente e AFB₁ foi analisada no sobrenadante.

Após a análise dos resultados, foi realizado outro conjunto de experimentos seguindo um planejamento estatístico 2^3 composto central com triplicata no ponto central.

A quantidade de 10 mg adsorvente em pó, correspondente a 0,2% (m/v), foi adicionada a tubos tipo Falcon de 50 mL, 4,5 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L (pH 5, 7 e 9) e 0,5 mL de padrão de AFB₁ em metanol (50, 100 e 150 ng/mL). Os tubos foram agitados a 250 r.p.m. por

20, 40 e 60 minutos e centrifugados a $4000 \times g$, por 10 minutos a 25 °C. Controles (sem adsorvente) foram preparados simultaneamente e AFB₁ foi analisada no sobrenadante.

Extração de AFB₁: A extração de AFB₁ foi realizada segundo o método descrito por Soares e Rodriguez-Amaya (1989). A uma alíquota de 4,0 mL do sobrenadante dos testes de adsorção, foram acrescentados 21,6 mL de metanol (CH₃OH) e 2,4 mL de cloreto de potássio (KCl) 4%, seguido de homogeneização em *shaker* por 5 minutos e filtração em papel de filtro Whatman nº 1. Uma alíquota de 14,0 mL do filtrado foi retirada e adicionada de 14,0 mL de sulfato cúprico (CuSO₄) 10 % e cerca de 10 g de celite. Após homogeneização, o material foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 1 e 14,0 mL do filtrado adicionados de 14,0 mL de água destilada. A este, foram acrescentados 2,0 mL de clorofórmio, para o processo de partição. O conteúdo foi agitado por 3 minutos e após 5 minutos de decantação, foram coletados 1,5 mL, acrescentados mais 2,0 mL de clorofórmio à solução e agitados por mais 3 minutos, decantados por 5 minutos e coletados mais 1,5 mL. As duas frações de clorofórmio foram reunidas, passadas através de filtro de 0,45 µm (Millex, Millipore® Durapore) e evaporadas sob fluxo de N₂ em banho-maria a 45 °C. As amostras foram estocadas a -20 °C até serem analisadas.

Determinação de AFB₁: As alíquotas de 3,0 mL, secas sob fluxo de N₂ em banho-maria a 45 °C foram submetidas à derivatização, segundo o método de Miyamoto, Hamada e Kawamura (2008), pela adição de 100 µL de ácido trifluoroacético (TFA), agitadas por 30 segundos, sonicadas por 5 minutos e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, na ausência de luz. TFA foi adicionado às soluções-padrão de AFs nas mesmas condições. Após o período de incubação das amostras, foram adicionados 900 µL de metanol:água (55:45, v/v) e a solução foi agitada por 15 segundos, segundo o método de Blandino, Reyneri e Vanara (2008), sendo uma alíquota de 20 µL da amostra injetados no cromatógrafo líquido de alta eficiência.

O sistema cromatográfico consistiu de um equipamento Shimadzu (Kyoto, Japan) SCL-10AVP equipado com uma bomba LC-10AT, um injetor Rheodyne modelo 7725i e um detector de fluorescência RF-10A XL com comprimentos de onda de excitação e emissão de 360 nm e 435 nm, respectivamente, e sistema isocrático de fase reversa. A separação foi realizada em coluna Luna C-18 Phenomenex (250 x 4,6 mm de diâmetro interno, 5 µm, Scharlau, Barcelona, Spain). A fase móvel consistiu de metanol:água (55:45, v/v), bombeada a um fluxo de 1 mL/min e a temperatura do forno constante a 25 °C.

A quantidade de AFB₁ adsorvida foi estimada pela quantidade remanescente no sobrenadante após os testes de adsorção *in vitro*.

Análise Estatística: Foi aplicada análise de variância ANOVA ao nível de 95% de confiança e metodologia de superfície de resposta (MSR) por meio do software Statistica 6.0 (Stat Soft, Inc.).

Resultados e Discussão

O modelo do planejamento estatístico 2⁴ apresentou um coeficiente de determinação ($R^2 = 0,91$) satisfatório ao nível de 95% de confiança, no entanto, houve uma perda na visualização devido à variação experimental entre as variáveis, seguindo a direção do ponto máximo, sendo necessário um ajuste nesse modelo.

Assim, foi realizado um planejamento estatístico 2³ composto central com triplicata no ponto central, que apresentou modelo quadrático estatisticamente significativo ($R^2 = 0,83$) e sem falta de ajuste no nível de 95% de confiança, de acordo com a Equação 1, com a concentração de toxina como única variável significativa. Na Equação 1 estão apresentadas as variáveis do modelo quadrático com os respectivos erros padrão dos coeficientes.

$$\hat{y} = 11.95 - 1.06pH - 2.08pH^2 + 0.99t + 1.97t^2 + 5.5[AFB_1] \\ (\pm 0.7) \quad (\pm 0.27) \quad (\pm 0.33) \quad (\pm 0.27) \quad (\pm 0.33) \quad (\pm 0.27) \\ + 0.56[AFB_1] - 0.74pH \times t - 1.24pH \times AFB_1 + 1.78t \times AFB_1 \\ (\pm 0.33) \quad (\pm 0.35) \quad (\pm 0.35) \quad (\pm 0.35)$$

Equação 1 – Variáveis do modelo quadrático com os respectivos erros padrão dos coeficientes.

Onde:

\hat{y} = quantidade adsorvida, e os valores entre parênteses são os erros padrão

Na Figura 1 estão apresentadas as curvas de nível das respostas do planejamento estatístico 2³. Observa-se que ocorreu maior adsorção de AFB₁ (25 ng/mg) em

pH 7. Em pH 5 ocorreu adsorção de 20 ng/mg e em pH 3,64 houve adsorção de 10 ng/mg, sendo necessário um aumento na concentração de toxina para uma maior adsorção.

Desheng *et al.* (2005), avaliando a adsorção de AFB₁ por montimorilonita em soluções aquosas em pH 2 e 8 encontraram quantidades máximas adsorvidas de 613,5 e 628,9 µg de AFB₁/g de montimorilonita, nos respectivos valores de pH.

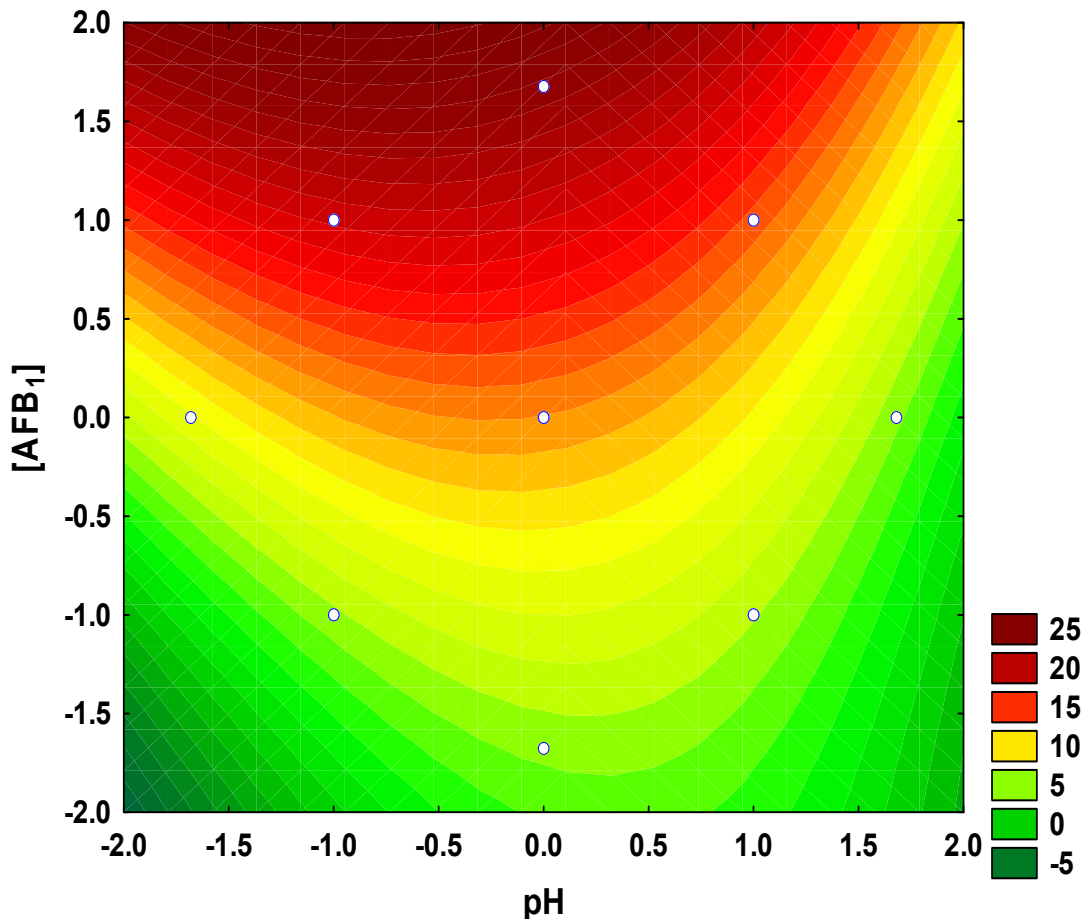


Figura 1 – Curvas de nível das respostas do planejamento estatístico 2³.

Ye *et al.* (2009) analisaram a adsorção de AFB₁ em humato de sódio, um adsorvente orgânico que contém muitos grupos ativos, e diferentes condições de pH (3,0, 7,0 e 8,0), quantidade de adsorvente (4,0, 10,0 e 20,0 mg), tempo de interação (30, 45, 60, 75 e 90 minutos) e concentração inicial de AFB₁ (20, 40, 60, 80 e 100 ng/mL) e demonstraram que, à medida que o valor do pH era aumentado, a quantidade de AFB₁ adsorvida aumentava.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados dos experimentos de adsorção de AFB₁ *in vitro* baseados em planejamento estatístico 2³ composto central com triplicata no ponto central, em relação à quantidade adsorvida em ng de AFB₁/mg de adsorvente. Houve alteração na quantidade de AFB₁ adsorvida em relação à concentração de toxina, variando de

4,1 ng/mg (50 ng/mL de AFB₁) a 4,73 ng/mg (150 ng/mL de AFB₁). Nos experimentos de adsorção 3 e 7, cujas concentrações de AFB₁ foram alteradas (50 para 150 ng/mL) e mantidas as condições de pH 5,0 e 60 minutos de tempo de interação, a adsorção aumentou de 4,1 para 22,97 ng/mg. Da mesma forma, nos experimentos 2 e 6, cujas concentrações de toxina foram alteradas (50 para 150 ng/mL) e mantidas as condições de pH 9,0 e 20 minutos de tempo de interação, a adsorção aumentou de 4,73 para 11,5 ng/mg.

Tabela 3 – Resultados dos experimentos de adsorção *in vitro* de aflatoxina B₁ baseados em planejamento estatístico 2³ composto central com triplicata no ponto central, em relação à quantidade adsorvida em ng de AFB₁/mg de adsorvente.

Experimentos	pH	Tempo (min)	AFB ₁ (ng/mL)	Qdade. adsorvida (ng/mg)
1	5	20	50	4,1
2	9	20	50	4,73
3	5	60	50	4,1
4	9	60	50	4,73
5	5	20	150	12,88
6	9	20	150	11,5
7	5	60	150	22,97
8	9	60	150	15,67
9	7	40	100	10,67
10	7	40	100	11,37
11	7	40	100	12,07
12	3,64	40	100	11,47
13	10,36	40	100	7,25
14	7	6,4	100	21,02
15	7	73,6	100	20,59
16	7	40	16	8,0
17	7	40	184	25,65

As quantidades adsorvidas variaram de 4,1 a 22,97 ng/mg (pH 5), de 4,73 a 15,67 ng/mg (pH 9) e de 10,67 a 12,07 ng/mg (pH 7). Comparando-se os experimentos 7 e 8, em que os valores de pH foram alterados (5 para 9) e mantidos os tempos de interação de 60 minutos e 150 ng/mL de toxina, a quantidade adsorvida variou de 15,67 a 22,97 ng/mg (Tabela 3).

Denli *et al.* (2006), avaliando a adição de 2,5 g/kg de HSCAS, diatomita e carvão ativado em dietas contendo 0, 40 ou 80 µg AFB₁/kg de ração na redução dos efeitos negativos de AFB₁ em dietas de frangos de corte (n = 180) concluíram que HSCAS é o adsorvente mais eficaz para diminuir os efeitos negativos de AFB₁ em frangos de corte e em

contrapartida, diatomita ou carvão ativado não conseguiram evitar os efeitos nocivos de AFB₁ em frangos de corte.

Phillips *et al.* (1988) relataram que HSCAS removeu mais de 80 % de AFB₁ em solução, demonstrando uma alta afinidade do adsorvente por AFB₁.

O presente estudo mostrou que nas condições dos testes de adsorção *in vitro* a mistura de adsorventes foi eficaz, apresentando boa adsorção na faixa de pH entre 5 e 7, abrangendo a faixa encontrada no trato gastrointestinal de ruminantes e animais monogástricos, minimizando os riscos de contaminação por aflatoxinas.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, Fundação Araucária, PPSUS/ Ministério da Saúde, Fundo Paraná/ SETI, CAPES e SLO Agropecuária e Biotecnologia Ltda pelo apoio financeiro.

Referências

- Abbès, S., J.B. Salah-Abbès, M.M. Hetta, M. Ibrahim, M.A. Abdel-Wahhab, H. Bacha, R. Oueslati. 2008. Efficacy of Tunisian montmorillonite for *in vitro* aflatoxin binding and in vivo amelioration of physiological alterations. *Appl. Clay Sci.* 42: 151-157.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 16 dez. 2009.
- AOAC – Official Methods for Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 1990. 15th ed., v. 2. Arlington: chapter 49, 1184-1199.
- Avantaggiato, G., M. Solfrizzo, A. Visconti. 2005. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. *Food Addit. Contam.* 22 (4): 379-388.
- Blandino, M., A. Reyneri, F. Vanara. 2008. Influence of nitrogen fertilization on mycotoxin contamination of maize kernels. *Crop Prot.* 27: 222-230.
- Bata, Á., R. Lásztity. 1999. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends Food Sci. Tech.* 10: 223-228.
- Cole, R.J., R.H. Cox. Handbook of toxic fungal metabolites. New York: Academic Press, 987: 1981.
- Daković, A., S. Matijašević, G.E. Rottinghaus, D.R. Ledoux, P. Butkeraitis, Z. Sekulić. 2008. Aflatoxin B₁ adsorption by natural and copper modified montmorillonite. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 66: 20-25.
- Denli, M., F. Okan. 2006. Efficacy of different adsorbents in reducing the toxic effects of aflatoxin B₁ in broiler diets. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 36 (4): 222-228.
- Desheng, Q., L. Fan, Y. Yanhu, Z. Niya. 2005. Adsorption of Aflatoxin B₁ on Montmorillonite. *Poult. Sci.* 84: 959-961.
- Filippidis, A., A. Godelitsas, D. Charistos, P. Misaelides, A. Kassoli-Fournaraki. 1996. The chemical behavior of natural zeolites in aqueous environments: Interactions between low-silica zeolites and 1 M NaCl solutions of different initial pH-values. *Appl. Clay Sci.* 11: 199-209.
- Hinton, D.M., M.J. Myers, R.A. Raybourne, S. Francke-Carroll, R.E. Sotomayor, J. Shaddock, A. Warbritton, M.W. Chou. 2003. Immunotoxicity of aflatoxin B₁ in rats: effects on lymphocytes and the inflammatory response in a chronic intermittent dosing study. *Toxicol. Sci.* 73: 362–377.
- Hussein, H.S., J.M. Brasel. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167: 101-134.
- Huwig, A., S. Freimund, O. Käppeli, H. Dutler. 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicol. Lett.* 122: 179-188.
- International Agency for Research on Cancer – IARC, 1993. Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemical to Humans. Some naturally occurring substances. Food Items and

Constituents. Heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Monographs Vol. 56. Lyon: IARC, 359–362.

Jouany, J.P., Yiannikouris, A., G. Bertin. 2005. The chemical bonds between mycotoxins and cell wall components of *Saccharomyces cerevisiae* have been identified. *Archiva Zootechnica* 8: 26-50.

Klich, M.A., J.I. Pitt. 1988. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 91 (1): 99-108.

Kubena, L.F., R.B. Harvey, R.H. Bailey, S.A. Buckley, G.E. Rottinghaus. 1998. Effects of a Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate (T-Bind™) on Mycotoxicosis in Young Broiler Chickens. *Poult. Sci.* 77: 1502-1509.

Ledoux, D.R., G.E. Rottinghaus, A.J. Bermudez, M. Alonso-Debolt. 1998. Efficacy of a Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate to Ameliorate the Toxic Effects of Aflatoxin in Broiler Chicks. *Poult. Sci.* 77: 204-210.

Miazzo, R., C.A.R. Rosa, E.C.Q. Carvalho, C. Magnoli, S.M. Chiacchiera, G. Palacio, M. Saenz, A. Kikot, E. Basaldella, A. Dalcero. 2000. Efficacy of Synthetic Zeolite to Reduce the Toxicity of Aflatoxin in Broiler Chicks. *Poult. Sci.* 79: 1-6.

Miyamoto, K., A. Hamada, O. Kawamura. 2008. Determination of aflatoxins in corn and peanut by an immunoaffinity column bound AF.2 monoclonal antibody-HPLC method. *Technical Bulletin of Faculty of Agriculture, Kagawa University* vol. 60, n°113, 75-81.

Phillips, T.D., Kubena, L.F., Harvey, R.B., Taylor, D.S., Heidelbaugh, N.D. 1988. Hydrated sodium calcium aluminosilicate: a high affinity sorbent for aflatoxin. *Poult. Sci.*, 67: 243-247.

Phillips, T.D. 1999. Dietary Clay in the Chemoprevention of Aflatoxin-Induced Disease. *Toxicol. Sci.* 52: 118-126.

Ramos, A.J., E. Hernández. 1996. *In vitro* aflatoxin adsorption by means of a montmorillonite silicate. A study of adsorption isotherms. *Anim. Feed Sci. Technol.* 62: 263-269.

Ramos, A.J., E. Hernández. 1997. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs. A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 65: 197-206.

Rosa, C.A.R., R. Miazzo, V. Magnoli, V. Salvano, S.M. Chiacchiera, S. Ferrero, M. Saenz, E.C.Q. Carvalho, A. Dalcero. 2001. Evaluation of the Efficacy of Bentonite from the South of Argentina to Ameliorate the Toxic Effects of Aflatoxin in Broilers. *Poult. Sci.* 80: 139-144.

Rustom, I.Y.S. 1996. Aflatoxin in food and feed occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chem.* 59 (1): 57-67.

Santin, E., A.C. Paulillo, A. Maiorka, L.S.O. Nakaghi, M. Macari, A.V.F. Silva, A.C. Alessi. 2003. Evaluation of the Efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall to Ameliorate the Toxic Effects of Aflatoxin in Broilers. *Int. J. Poult. Sci.* 2 (5): 341-344.

- Schell, T.C., M.D. Lindemann, E.T. Kornegay, D.J. Blodgett. 1993. Effects of Feeding Aflatoxin-Contaminated Diets With and Without Clay to Weanling and Growing Pigs on Performance, Liver Function, and Mineral Metabolism. *J. Anim. Sci.* 71: 1209-1218.
- Shi, Y.H., Z.R. Xu, J.L. Feng, C.Z. Wang. 2006. Efficacy of modified montmorillonite nanocomposite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Anim. Feed Sci. Technol.* 129: 138-148.
- Soares, L.M.V., D.B. Rodriguez-Amaya. 1989. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem. Internat., Washington* 72 (1): 22-26.
- Yiannikouris, A., J.- P. Jouany. 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Anim. Res.* 51: 81-99.
- Ye, S.Q., X.Z. Lv, A.G. Zhou. 2009. *In vitro* Evaluation of the Efficacy of Sodium Humate as an Aflatoxin B₁ Adsorbent. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 3 (2): 1296-1300.
- Yu, J., T.E. Cleveland, W.C. Nierman, J.W. Bennett. 2005. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to disease. *Rev. Iberoam. Micol.* 22: 194-202.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, H. K.; CARTWRIGHT, R. D.; XIE, W.; SHIER, W. T. 2006. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. **Crop Protection**, 25(1), 1–9.
- ABBÈS, S.; SALAH-ABBÈS, J. B.; HETTA, M. M.; IBRAHIM, M.; ABDEL-WAHHAB, M. A.; BACHA, H.; OUESLATI, R. 2008. Efficacy of Tunisian montmorillonite for *in vitro* aflatoxin binding and in vivo amelioration of physiological alterations. **Applied Clay Science** 42, 151-157.
- Associação Brasileira das Indústrias do Milho – ABIMILHO. 2006. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br>>. Acesso em: 16 Dez. 2009.
- ALMEIDA, P. A.; FONSECA, H.; FANCELLI, A. L.; DIREITO, G. M.; ORTEGA, E. M.; CORREA, B. 2002. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50(13), 3877–3882.
- ALY, S. E.; ABDEL-GALIL, M. M.; ABDEL-WAHHAB, M. A. 2004. Application of adsorbent agents technology in the removal of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ from malt extract. **Food and Chemical Toxicology** 42, 1825-1831.
- AMADO, M. A. 1999. Aflatoxinas: Um Problema Mundial. *Millenium*, n. 16.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Legislação**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 16 dez. 2009.
- AOAC – Official Methods for Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 1990. 15th ed., v. 2. Arlington: chapter 49, p. 1184-1199.
- ARAÚJO, L. A. N.; FERREIRA, M. F.; CRUZ, M. C. P. 2004. Adubação nitrogenada na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p.771-777.
- AVANTAGGIATO, G.; HAVENAAR, R.; VISCONTI, A. 2003. Assessing the zearalenone-binding activity of adsorbent materials during passage through in vitro gastrointestinal model. **Food and Chemical Toxicology** 41, 1283-1290.
- AVANTAGGIATO, G.; SOLFRIZZO, M.; VISCONTI, A. 2005. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. **Food Additives and Contaminants** 22 (4), 379-388.
- BARROS-NETO, B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: Editora da Unicamp, 2001.
- BATA, Á.; LÁSZTITY, R. 1999. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. **Trends Food Science Technology** 10, 223-228.
- BEARE, M. H.; HU, S.; COLEMAN, D. C.; HENDRIX, P. F. 1997. Influences of mycelial fungi on soil aggregation and organic matter storage in conventional and no-tillage soils. **Applied Soil Ecology** 5, 211-219.

- BENNETT, J. W.; KLICH, M. 2003. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews** 16, 497-516.
- BETINA, V. Biological effects of mycotoxins. In: V. Betina (Editor), *Mycotoxins: Chemical, Biological and Environmental Aspects*. **Elsevier**, Amsterdam, 42-58, 1989.
- BEZUIDENHOUT, S.C.; GELDERBLOM, W.C.A.; GORST-ALLMAN, C.P.; HORAK, R.M.; MARASAS, W.F.O.; SPITELLER, G.; VLEGGAR, R. 1988. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, 743-745.
- BINDER, E. M. 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. **Animal Feed Science and Technology** 133, 149-166.
- BITTENCOURT, A. B. F.; OLIVEIRA, C. A. F.; DILKIN, P.; CORRÊA, B. 2005. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. **Food Control** 16, 117-120.
- BLANDINO, M.; REYNERI, A.; VANARA, F. 2008. Influence of nitrogen fertilization on mycotoxin contamination of maize kernels. **Crop Protection** 27, 222-230.
- CANADY, R.A.; COKER, R.D.; EGAN, S.K.; KRASKA, R.; OLSEN, M.; RESNIK, S.; SCHLATTER, J. 2001. T-2 and HT-2 toxins. In WHO/IPCS Safety evaluation of certain mycotoxins in food. **WHO Food Additives Series** 47, 557-680 <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je06.htm>>.
- CAST. Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems. Council for Agricultural Science and Technology, (K. Niyoy, ed.), Task Force Report 139, Ames, Iowa, USA. 1-199, 2003.
- CATTELAN, A. J.; VIDOR, C. Sistemas de culturas e a população microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, 125-131, 1990.
- CHU, F. S. Recent studies on immunoassays for mycotoxin. In: Beier RC, Stanker LH, eds. *Immunoassays for Residue Analysis*, **American Chemical Society**, Washington, DC, 294-313, 1996.
- CHU, F. S. 1991. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. **Mutation Research/ Genetic Toxicology** 259, n. 3-4, 291-306.
- COELHO, A. M.; FRANÇA, G. E.; PITTA, G. V. E.; ALVES, V. M. C.; HERNANI, L. C. Cultivo do milho-Nutrição e Adubação. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Comunicado Técnico 44**, Minas Gerais, Brasil: Embrapa, Sete Lagoas, 2002.
- COLE, R. J.; COX, R. H. Handbook of toxic fungal metabolites. New York: **Academic Press**, 987, 1981.
- Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB. Milho: Análise perspectiva do mercado-safra 2005/2006. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em 20 dez. 2009.

Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB. Brazilian Crop Assessment: grain. **Braslian Harvest of Grains**, Second Survey. National Supply Company. Brasília: Conab, 2009.

CRUZ, J. C.; ALVARENGA, R. C.; NOVOTNY, E. H.; FILHO, I. A. P.; SANTANA, D. P.; PEREIRA, F. T. F.; HERNANI, L. C. 2002. **Cultivo de Milho: Sistema Plantio Direto**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, p.1-7. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado Técnico, n.51).

DAKOVIĆ, A.; MATIJAŠEVIĆ, S.; ROTTINGHAUS, G. E.; LEDOUX, D. R.; BUTKERAITIS, P.; SEKULIĆ, Z. 2008. Aflatoxin B₁ adsorption by natural and copper modified montmorillonite. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 66, 20-25.

DAKOVIĆ, A.; TOMAŠEVIĆ-ČANOVIĆ, M.; DONDUR, V.; ROTTINGHAUS, G. E.; MEDAKOVIĆ, V.; ZARIĆ, S. 2005. Adsorption of mycotoxins by organozeolites. **Colloids and Surfaces B** 46, 20-25.

DAWSON, K. A. Anatomia do adsorvente de micotoxinas à base de carboidratos. **Feeding Times** 7, n. 3, 1-38, 2002.

DENLI, M.; OKAN, F. 2006. Efficacy of different adsorbents in reducing the toxic effects of aflatoxin B₁ in broiler diets. **South African Journal of Animal Science** 36 (4), 222-228.

DESHENG, Q.; FAN, L.; YANHU, Y.; NIYA, Z. 2005. Adsorption of Aflatoxin B₁ on Montmorillonite. **Poultry Science** 84, 959-961.

DESHPANDE, S. S. Handbook of Food Toxicology. **CRC Press**. Marcel Dekker, Inc. New York, NY, USA, 2002.

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

DRURY, C. F.; YANG, X. M.; REYNOLDS, W. D.; TAN, C. S. 2004. Influence of crop rotation and aggregate size on carbon dioxide production and denitrification. **Soil & Tillage Research** 79, 87-100.

EL-NEZAMI, H.; POLYCHRONAKI, N.; LEE, Y.; HASKARD, C.; JUVONEN, R.; SALMINEN, S.; MYKKANEN, H. 2004. Chemical moieties and interactions involved in the binding of Zearalenone to the surface of *Lactobacillus rhamnosus* strains GG. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 52, 4577-4581.

FONSECA, H. **Micotoxinas**. Disponível em: <www.micotoxinas.com.br>. Acesso em: 01 dezembro 2009.

FILIPPIDIS, A.; GODELITSAS, A.; CHARISTOS, D.; MISAEELIDES, P.; KASSOLI-FOURNARAKI, A. 1996. The chemical behavior of natural zeolites in aqueous environments: Interactions between low-silica zeolites and 1 M NaCl solutions of different initial pH-values. **Applied Clay Science** 11, 199-209.

FORGACS, J.; CARLL, W. T. 1962. Mycotoxicoses. **Advances in Veterinary Science** 7, 273-382.

- GARCÍA-FONSECA, S.; BALLESTEROS-GÓMEZ, A.; RUBIO, S.; PÉREZ-BENDITO, D. 2008. Coacervative extraction of Ochratoxin A in wines prior to liquid chromatography/fluorescence determination. **Analytica Chimica Acta** 617, 3-10.
- GIRAY, B.; GIRGIN, G.; ENGIN, A. B.; AYDIN, S.; SAHIN, G. 2007. Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey. **Food Control** 18, 23-29.
- GRANT, P. G.; PHILLIPS, T. D. 1998. Isothermal adsorption of aflatoxin B₁ on HSCAS clay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 46, 599-605.
- GOTO, T.; WICKLOW, D. T.; ITO, Y. 1996. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing *Aspergillus tamaris* strain. **Applied and Environmental Microbiology** 62, n. 11, 4036–4038.
- HASSEGAWA, R. H.; FONSECA, H.; FANCELLI, A. L.; SILVA, V. N.; SCHAMMASS, E. A.; REIS, T. A.; CORRÊA, B. 2008. Influence of macro- and micronutrient fertilization on fungal contamination and fumonisin production in corn grains. **Food Control** 19, 36-43.
- HINTON, D. M.; MYERS, M. J.; RAYBOURNE, R. A.; FRANCKE-CARROLL, S.; SOTOMAYOR, R. E.; SHADDOCK, J.; WARBRITTON, A.; CHOU, M. W. 2003. Immunotoxicity of aflatoxin B₁ in rats: effects on lymphocytes and the inflammatory response in a chronic intermittent dosing study. **Toxicological Sciences** 73, 362–377.
- HIROOKA, E. Y.; YAMAGUCHI, M. M.; AOYAMA, S. ; SUGIURA, Y.; UENO, Y. 1996. The natural occurrence of fumonisin in Brazilian corn kernels. **Food Additives and Contaminants** 13, 173-183.
- HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology** 167, 101-134.
- HUWIG, A., FREIMUND, S., KÄPPELI, O., DUTLER, H., 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters** 122, 179-188.
- International Agency for Research on Cancer – IARC, 1993. Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemical to Humans. Some naturally occurring substances. Food Items and Constituents. Heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **Monographs** Vol. 56. Lyon: IARC, p. 359–362.
- International Agency for Research on Cancer – IARC, 2002. Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. Summary of Data Reported and Evaluation. **Monographs** Vol. 82. Lyon: IARC, p.171-300.
- IBRAHIM, I. K.; SHAREEF, A. M.; AL-JOUBORY, K. M. T. 2000. Ameliorative effects of sodium bentonite on phagocytosis and Newcastle disease antibody formation in broiler chickens during aflatoxicosis. **Research in Veterinary Science** 69, 119–122.
- JAYNES, W.F.; ZARTMAN, R. E.; HUDNALL, W. H. 2007. Aflatoxin B₁ adsorption by clays from water and corn meal. **Applied Clay Science** 36, 197-205.

- JOUANY, J. P.; YIANNIKOURIS, A.; BERTIN, G. 2005. The chemical bonds between mycotoxins and cell wall components of *Saccharomyces cerevisiae* have been identified. **Archiva Zootechnica** 8, 26-50.
- KLICH, M. A.; PITT, J. I. 1988. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. **Transactions of the British Mycological Society** 91 (1), 99-108.
- KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; BAILEY, R. H.; BUCKLEY, S. A.; ROTTINGHAUS, G. E. 1998. Effects of a Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate (T-Bind™) on Mycotoxicosis in Young Broiler Chickens. **Poultry Science** 77, 1502-1509.
- KUMAR, V., BASU, M. S., RAJENDRAN, T. P., 2008. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection** 27, 891-905.
- LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E.; BERMUDEZ, A. J.; ALONSO-DEBOLT, M. 1998. Efficacy of a Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate to Ameliorate the Toxic Effects of Aflatoxin in Broiler Chicks. **Poultry Science** 77, 204-210.
- LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E.; BERMUDEZ, A. J.; ALONSO-DEBOLT, M. 1999. Efficacy of a Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate to Ameliorate the Toxic Effects of Aflatoxin in Broiler Chicks. **Poultry Science** 78, 204-210.
- LOPEZ-GARCIA, R.; PARK, D. L. 1998. Effectiveness of post-harvest procedures in management of mycotoxin hazards. In D. Bhatnagar e S. Sinha, eds. **Mycotoxins in agriculture and food safety**, p. 407-433. New York, Marcel Dekker.
- LOPEZ-GARCIA, R.; PARK, D. L.; PHILLIPS, T. D. 1999. Integrated mycotoxin management systems. **Food, Nutrition and Agriculture** 23, 38-47.
- MAGGON, K. K.; GUPTA, S. K.; VENKITASUBRAMANIAN, T. A. 1977. Biosynthesis of Aflatoxins. **Bacteriological Reviews** 41, 822-855.
- 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.
- MARÍN, S.; SANCHIS, V.; MAGAN, N. Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. **Canadian Journal of Microbiology** 41, 1063-1070, 1995.
- MARTINS, H. M.; ALMEIDA, I.; MARQUES, M. F.; GUERRA, M. M. 2008. Fumonisin and deoxynivalenol in corn-based food products in Portugal. **Food and Chemical Toxicology** 46, 2585-2587.
- MIAZZO, R.; ROSA, C. A. R.; CARVALHO, E. C. Q.; MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S. M.; PALACIO, G.; SAENZ, M.; KIKOT, A.; BASALDELLA, E.; DALCERO, A. 2000. Efficacy of Synthetic Zeolite to Reduce the Toxicity of Aflatoxin in Broiler Chicks. **Poultry Science** 79, 1-6.

- MILLER, J.D. Epidemiology of *Fusarium* Ear disease of Cereals. In: MILLER, J.D.; TRENHOLM, H.L. **Mycotoxins In Grain: Compounds Other Than Aflatoxin**. United States: Eagan® Press, 59-257, 1994.
- MILLER, J. D. 1995. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research** 31, n. 1, 1-16.
- MIYAMOTO, K.; HAMADA, A.; KAWAMURA, O. 2008. Determination of aflatoxins in corn and peanut by an immunoaffinity column bound AF.2 monoclonal antibody-HPLC method. **Technical Bulletin of Faculty of Agriculture, Kawaga University** vol. 60, nº 113, 75-81.
- MORENO, E. C. Microbiota fúngica e micotoxinas em milho cultivado sob diferentes práticas de manejo. 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- MORENO, E. C.; GARCIA, G. T.; ONO, M. A.; VIZONI, E.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. 2009. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. **Food Chemistry** 116, 220-226.
- MOSS, M. O. 1996. Mycotoxins. **Mycological Research** 100, 513-523.
- MUZILLI, O. Princípios e perspectiva de expansão. In: **INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ**. Plantio direto no Estado do Paraná. Londrina: IAPAR, p.11-17. Circular n.23, 1981a.
- MUZILLI, O. Manejo da Fertilidade do Solo. In: **INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ**. Plantio direto no Estado do Paraná. Londrina: IAPAR, p.43-58. Circular n.23, 1981b.
- NAZARENO, N. R. X. Ocorrência e Controle de Doenças. Cultura do Milho. In: **INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ**. Plantio direto no Estado do Paraná. Londrina: IAPAR, p.171-192. Circular n.23, 1981.
- NEAL, G. E.; EATON, D. L.; JUDAH, D. J.; VERMA, A. 1998. Metabolism and Toxicity of Aflatoxins M₁ and B₁ in Human-Derived *in vitro* Systems. **Toxicology and Applied Pharmacology** 151, 152-158.
- NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. *Fusarium* species – An illustrated manual for identification. Pennsylvania: **Pennsylvania State University Press**, 1983.
- OLIVEIRA, F. H. T.; NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; CANTARUTTI, R. B.; BARROS, N. F. 2002. Fertilidade do Solo no Sistema Plantio Direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo, Tópicos de Ciência do Solo** 2, 393-486.
- ONO, E. Y. S.; FUNGARO, M. H. P.; SOFIA, S. H.; FIGUEIRA, E. L. Z.; GERAGE, A. C.; ICHINOE, M.; SUGIURA, Y.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Y. 2004. Trends of fumonisin contamination and animal intoxication through monitoring 1991 to 1997 corn crop in the State of Paraná, Brazil. **Mycopathologia** 158, 451-455.

- ONO, E. Y.S.; BIAZON, L.; DA SILVA, M.; VIZONI, E.; SUGIURA, Y.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Y. 2006. Fumonisin in corn: Correlation with *Fusarium* sp. count, damaged kernels, protein and lipid content. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 49, 63–71.
- ORSI, R. B.; CORRÊA, B.; POSSI, C. R.; SCHAMMASS, E. A.; NOGUEIRA, J. R.; DIAS, S. M. C.; MALOZZI, M. A. B. 2000. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research** 36, 75-87.
- PAPAIIOANNOU, D.; KATSOULOS, P. D.; PANOUSIS, N.; KARATZIAS, H. 2005. The role of natural and synthetic zeolites as feed additives on the prevention and/or the treatment of certain farm animal diseases: A review. **Microporous Mesoporous Materials** 84, 161-170.
- PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A. (Ed.) **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. Viçosa: UFV, 429-485, 1999.
- PEREIRA, O. A. P. Situação atual de doenças da cultura do milho no Brasil e estratégias de controle. In: **Resistência genética de plantas a doenças**. Piracicaba. Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, p. 25-30, 1995.
- PHILLIPS, T. D.; KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; TAYLOR, D. R.; HEIDELBAUGH, N. D. 1988. Hydrated sodium calcium aluminosilicate. A high affinity sorbent for aflatoxin. **Poultry Science** 67, 243-247.
- PHILLIPS, T. D. 1999. Dietary Clay in the Chemoprevention of Aflatoxin-Induced Disease. **Toxicological Sciences** 52, 118-126.
- PITT, J.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 2 ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1997. 593 p.
- RAISSI, S.; FARSANI, R. E. 2009. Statistical Process Optimization Through Multi-Response Surface Methodology. **World Academy of Science, Engineering and Technology** 51, 267-271.
- RAMOS, A. J; HERNÁNDEZ, E. 1996. *In vitro* aflatoxin adsorption by means of a montmorillonite silicate. A study of adsorption isotherms. **Animal Feed Science and Technology** 62, 263-269.
- RAMOS, A. J; HERNÁNDEZ, E. 1997. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs. A review. **Animal Feed Science and Technology** 65, 197-206.
- RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F.; VISMER, H. F. 2002. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology** 68, 2101-2105.
- ROSA, C. A. R.; MIAZZO, R.; MAGNOLI, C.; SALVANO, M.; CHIACCHIERA, S. M.; FERRERO, S.; SAENZ, M.; CARVALHO, E. C. Q.; DALCERO, A. 2001. Evaluation of the Efficacy of Bentonite from the South of Argentina to Ameliorate the Toxic Effects of Aflatoxin in Broilers. **Poultry Science** 80, 139-144.
- ROTHROCK, C. S. 1992. Tillage systems and plant disease. **Soil Science** 154, 308-315.

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

SABINO, M. Ocorrência e métodos analíticos para a determinação de micotoxinas em grãos e rações. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MICOTOXINAS E MICOTOXICOSES EM AVES, Curitiba. Características gerais das micotoxinas e micotoxicozes. Campinas: **FACTA**, 35-47, 1995.

SAMSON, R. A.; REENEN-HOESKSTRA, E. S. **Introduction to food-borne fungi**. 3.ed. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1988.

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

SANTIN, E.; PAULILLO, A. C.; MAIORKA, A.; NAKAGHI, L. S. O.; MACARI, M.; SILVA, A. V. F.; ALESSI, A. C. 2003. Evaluation of the Efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall to Ameliorate the Toxic Effects of Aflatoxin in Broilers. **International Journal of Poultry Science** 2 (5), 341-344.

SCHELL, T. C.; LINDEMANN, M. D.; KORNEGAY, E. T.; BLODGETT, D. J. 1993. Effects of Feeding Aflatoxin-Contaminated Diets With and Without Clay to Weanling and Growing Pigs on Performance, Liver Function, and Mineral Metabolism. **Journal of Animal Science** 71, 1209-1218.

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

SHETTY, P. H.; BHAT, R. V. 1998. Sensitive method for the detection of fumonisin B₁ in human urine. **Journal of Chromatography B** 705, 171-173.

SHI, Y. H.; XU, Z. R.; FENG, J. L.; WANG, C. Z. 2006. Efficacy of modified montmorillonite nanocomposite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. **Animal Feed Science and Technology** 129, 138-148.

SILVA, M.; GARCIA, G. T.; VIZONI, É.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. 2008. Effect of the time interval from harvesting to the pre-drying step on natural fumonisin contamination in freshly harvested corn from the State of Paraná, Brazil. **Food Additives and Contaminants** 25 (5), 642-649.

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.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. 1989. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, Washington, v. 72, n. 1, 22-26.

- SQUIRE, R. A. 1981. Ranking animal carcinogens: a proposed regulatory approach. **Science** 214, 877–880.
- STOEV, S. D.; HALD, B.; MANTLE, P. G., 1998. Porcine nephropathy in Bulgaria: a progressive syndrome of complex of uncertain (mycotoxin) etiology. **Veterinary Record** 142, 190–194.
- SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W.; 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology** 43, 141-158.
- THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O.; SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. S.; GELDERBLUM, W. C. A.; NIEUWENHUIS. 1991. Survey of Fumonisin Production by *Fusarium* Species. **Applied and Environmental Microbiology** 57, n° 4, 1089-1093.
- TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S. A. 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta** 632, 168-180.
- UENO, Y.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; WANG, D. S.; LEE, U. S.; HIROOKA, E. Y.; HARA, S.; KARKI, T.; CHEN, G.; YU, S. Z. 1993. A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. **Mycotoxin Research** 9, 27-34.
- VAN EGMOND, H. P.; SCHOTHORST, R. C. 2007. Regulations relating to mycotoxins in food. **Journal of Analytical & Bioanalytical Chemistry** 389, 147-157.
- WANG, J.; ZHOU, Y.; LIU, W.; ZHU, X.; DU, L.; WANG, Q. 2008. Fumonisin level in corn-based food and feed from Linxian County, a high-risk area for esophageal cancer in China. **Food Chemistry** 106, 241-246.
- WATTS, C. M.; CHEN, Y. C.; LEDOUX, D. R.; BROOMHEAD, J. N.; BERMUDEZ, A. J.; ROTTINGHAUS, G. E. 2003. Effects of Multiple Mycotoxins and a Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate in Poultry. **International Journal of Poultry Science** 6, 372-378.
- WHITAKER, T. B. 2003. Standardisation of mycotoxin sampling procedures: an urgent necessity. **Food Control** 14, 233-237.
- WOGAN, G. N. 1966. Chemical Nature and Biological Effects of the Aflatoxins. **Bacteriological Reviews** 30, n. 2, 460-470.
- YABE, K.; MATSUSHIMA, K.; KOYAMA, T.; HAMASAKI, T. 1998. Purification and Characterization of *O*-Methyltransferase I Involved in Conversion of Demethylsterigmatocystin to Sterigmatocystin and of Dihydrodemethylsterigmatocystin to Dihydrosterigmatocystin during Aflatoxin Biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology** 64, n. 1, 166-171.
- YE, S. Q.; LV, X. Z.; ZHOU, A. G. 2009. *In vitro* Evaluation of the Efficacy of Sodium Humate as an Aflatoxin B₁ Adsorbent. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences** 3, n. 2, 1296-1300.
- YIANNIKOURIS, A.; JOUANY, J.-P. 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. **Animal Research** 51, 81–99.

YIANNIKOURIS, A.; POUGHON, L.; CAMELEYRE, X.; DUSSAP, C.; FRANÇOIS, J.; BERTIN, G.; JOUANY, J-P. 2003. A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* wall and mycotoxins: application to zearalenone. **Biotechnology Letters** 25, 783-789.

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

YU, J.; CLEVELAND, T. E.; NIERMAN, W. C.; BENNETT, J. W. 2005. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to disease. **Revista Iberoamericana de Micología** 22, 194-202.

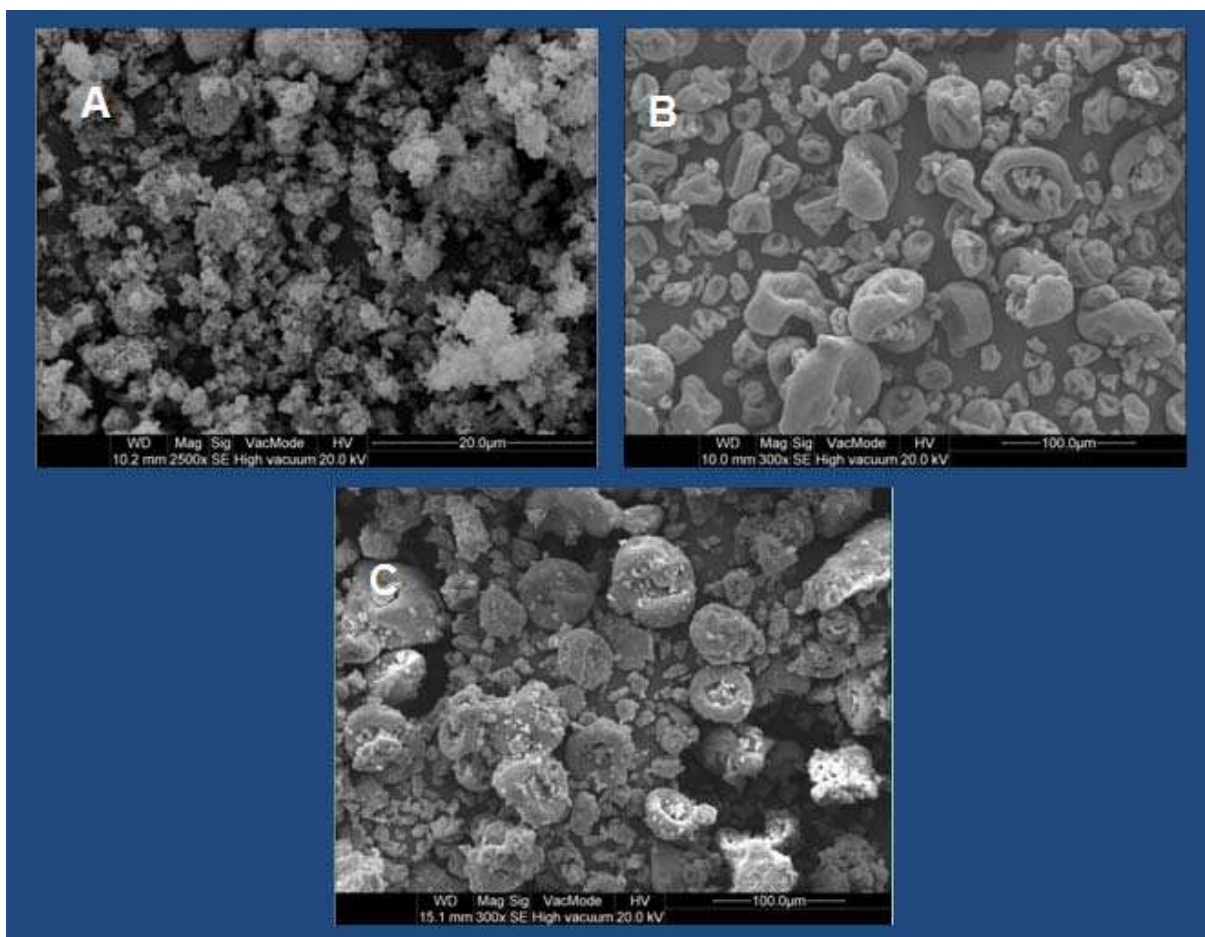
ZHENG, M. Z.; RICHARD, J. L.; BINDER, J. 2006. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. **Mycopathologia** 161, 261-273.

ZINEDINE, A., BRERA, C., ELAKHDARI, S., CATANO, C., DEBEGNAC, F. R., ANGELINI, S., et al. 2006. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. **Food Control** 17, 868–874.

ANEXOS

ANEXO A

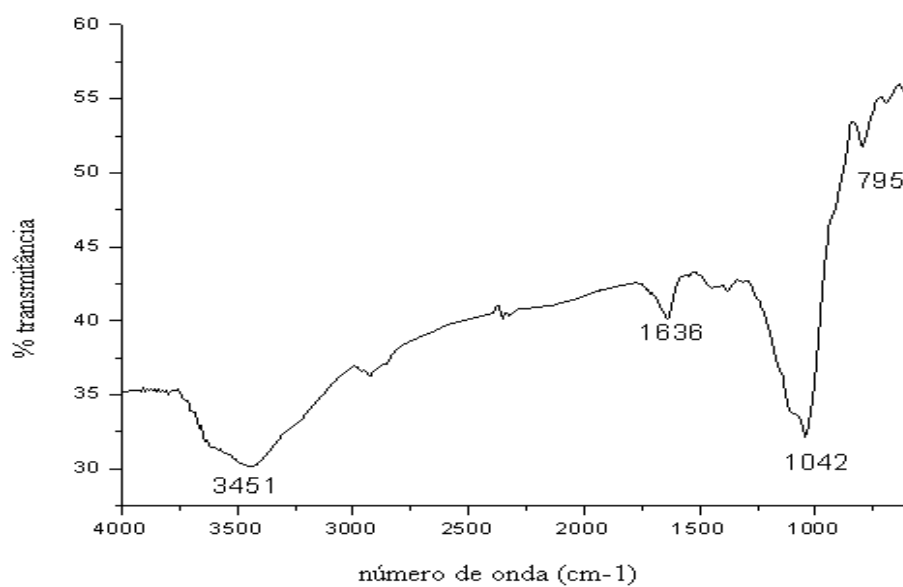
Microscopia eletrônica de varredura da superfície dos adsorventes



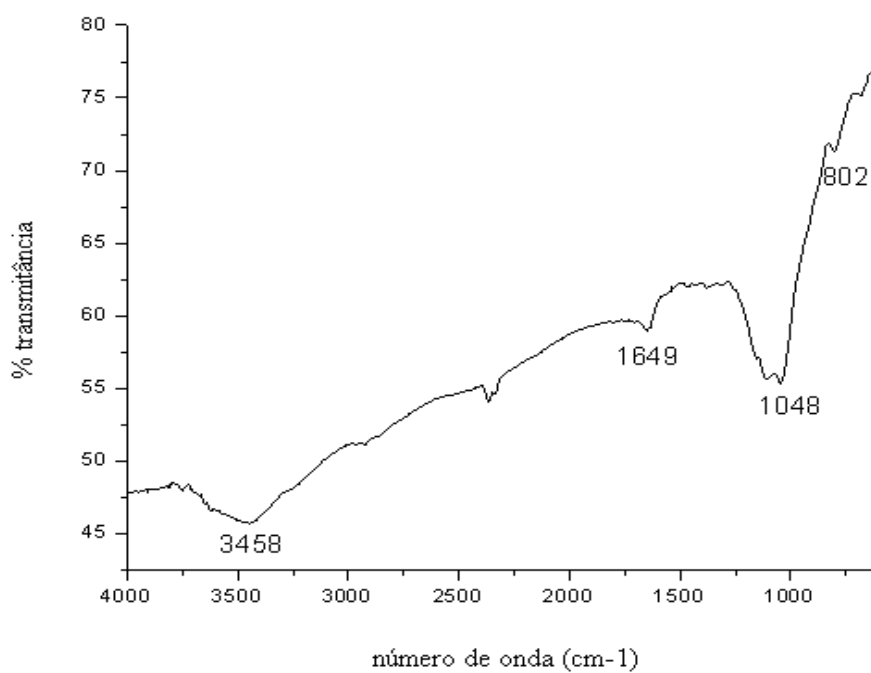
A = Fotomicrografia do aluminossilicato de sódio e cálcio hidratado (HSCAS), com aumento de 2500X; B = Fotomicrografia da parede celular de levedura, com aumento de 300X; C = Fotomicrografia da mistura de adsorventes (50% de HSCAS e 50% de parede celular de levedura), com aumento de 300X

ANEXO B

Espectros de absorção no infravermelho antes e após a realização do teste de adsorção de Afb₁



Espectro de absorção no infravermelho da mistura de adsorventes (50% de HSCAS e 50% de parede celular de levedura)



Espectro de absorção no infravermelho da mistura de adsorventes (50% de HSCAS e 50% de parede celular de levedura) após o teste de adsorção de AFB₁