



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MARCELO DA SILVA

**"AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE FUNGOS E  
MICOTOXINAS NA TECNOLOGIA DE PÓS-  
COLHEITA DO MILHO".**

---

Londrina  
2007

MARCELO DA SILVA

**"AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE FUNGOS E  
MICOTOXINAS NA TECNOLOGIA DE PÓS-  
COLHEITA DO MILHO".**

Dissertação apresentada ao Curso de  
Mestrado em Biotecnologia da Universidade  
Estadual de Londrina para obtenção do título  
de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa Dra. Elisabete Yurie  
Sataque Ono

Londrina  
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

633.15  
S586a

Silva, Marcelo da

Avaliação da presença de fungos e micotoxinas na tecnologia de pós-colheita do milho. / Marcelo da Silva. – Londrina, 2007

122f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, 2007.

Orientadora: Profª Drª Elisabete Yurie Sataque Ono

1. Milho – *Fusarium* spp. e fumonisinas 2. Análise de Aflatoxinas por Espectrofluorimetria , CCD, Contagem de pontos de fluorescência I. Título.

CDD 20.ed.

MARCELO DA SILVA

**"AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE FUNGOS E  
MICOTOXINAS NA TECNOLOGIA DE PÓS-COLHEITA  
DO MILHO".**

Dissertação apresentada ao Curso de  
Mestrado em Biotecnologia da Universidade  
Estadual de Londrina para obtenção do título  
de Mestre em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Gilvan Wosiacki Universidade  
Estadual de Ponta Grossa

---

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

Londrina, 23 de Fevereiro de 2007.

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono, pela dedicação, orientação e amizade no decorrer deste trabalho.

À Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade de realização deste trabalho e aos professores do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, pelos valiosos ensinamentos.

À FINEP pelo apoio financeiro.

À Fundação CAPES/MEC (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / Ministério da Educação), pela bolsa concedida.

À professora Dra. Elisa Yoko Hirooka, pela orientação valiosa, experiência de muitos anos de vida acadêmica.

À professora Dra. Maria Victória Eiras Grossmann, pelo apoio e colaboração.

Ao Professor Édio Vizoni pelo auxílio na análise estatística.

Ao professor Dr. Mario Augusto Ono pela colaboração.

Às Cooperativas, Integrada Cooperativa Agroindustrial, Kowaski Alimentos Ltda. e Caramuru Alimentos Ltda. que patrocinaram financeiramente o projeto.

À ADETEC (Agência de Desenvolvimento Tecnológico de Londrina e Região) pela coordenação administrativa do projeto, em especial ao Dr. Plínio Pinto de Mendonça Uchoa Júnior.

Ao gerente administrativo da Cooperativa Integrada, Sr. Glauco Tironi Garcia pelo apoio logístico na aquisição das amostras de milho.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Nelson Janeiro Rodriguez, Sérgio do Nascimento Evangelista, Elda Jonas Aguiar e Sílvia B. da Costa Avelino, e aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Patrícia Sambatti, Berenice Figueiredo.

Ao Jurandir Pereira Pinto pelos valiosos ensinamentos em cromatografia líquida de alta eficiência.

Aos colegas de curso e de laboratório Adriana Pereira da Silva, Daniel Marchetti Maroneze, Elaine Cunha Moreno, Fernando Ártico Fracção, Marco Antonio Volso, Heberty de Marco, Paula Garcia Meirelles, Flávio Castilho, Daniele Sassá, Cassiano Correa da Silva, Michele Cristina Tanoue Batista, Robson Alessandro Machado, Íris Tiski, Elisabete H. Hashimoto, Simone Fuji, Ricardo Marcelo Reiche, Alexandre Coelho e Luciana Berned.

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

Dedico este trabalho como sinal do mais profundo agradecimento e carinho, aos meus atenciosos pais Henrique Silva Neto e Eunice Garcia Silva, a minha amada esposa, Maria Isabel Soares Feitosa, pelo apoio constante em todos os momentos e àquela que representa a continuidade de minha existência, minha querida filha Alessa Feitosa Silva.

A Deus, criador de toda a natureza.

*"Et ait: germinet terra herbam virentem et facientem sêmen, et lignum pomiferum faciens fructum iuxta genus suum, cuius sêmen in semetipso sit super terram. Et factum est ita. Et protulit terra herbam virentem, et facientem sêmen iuxta genus suum, lignumque faciens fructum, et habens unumquodque sementem secundum speciem suam. Et vidit Deus quod esset bonum. Et factum est vespere et mane, dies tertius".*

(Gênesis 3: 11-13).



SILVA, Marcelo da. **Avaliação da presença de fungos e micotoxinas na tecnologia de pós-colheita do milho**. 2007. 115 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

## RESUMO

O milho, cereal importante no Brasil, como componente de rações animais e como matéria-prima incluída em mais de 500 produtos derivados, devido a sua qualidade nutricional torna-se substrato para contaminação por fungos toxigênicos. Com o objetivo de avaliar o efeito do intervalo de tempo entre a colheita e a pré-secagem sobre a contaminação de milho por fungos e fumonisinas, 490 amostras foram coletadas em três pontos da cadeia produtiva, campo (n=100), recepção da cooperativa (n=100) e pré-secagem (n=45) de duas safras consecutivas (2003 e 2004) da Região Norte do Estado do Paraná. *Fusarium* spp. foi o gênero prevalente (100%), seguido por *Penicillium* spp. que foi detectado em 98%, 95% e 97% das amostras de campo, recepção e etapa de pré-secagem (safra 2003), respectivamente. As fumonisinas foram detectadas em todas as amostras de ambas as safras, com níveis variando de 0,11 a 15,32 mg/g em amostras de campo, de 0,16 a 15,90 mg/g em amostras de recepção e de 0,02 a 18,78 mg/g em amostras de pré-secagem para safra de 2003. As amostras de 2004 apresentaram menor nível de contaminação, com teores variando de 0,07 a 4,78 mg/g em amostras de campo, de 0,03 a 4,09 mg/g em amostras de recepção e de 0,11 a 11,21 mg/g em amostras de pré-secagem. Os níveis médios de fumonisinas aumentaram gradualmente de < 5,00 mg/g para 18,78 mg/g quando o intervalo de tempo entre a colheita e a pré-secagem aumentou de 3,2 para 8,9 horas (safra 2003). O mesmo perfil foi apresentado pelas amostras da safra de 2004. Os níveis de fumonisinas e o intervalo de tempo entre colheita e pré-secagem apresentaram correlação positiva ( $D=0,96$ ) ( $p<0,05$ ), sugerindo que o retardo da secagem contribui para o aumento na contaminação por fumonisinas em milho. A qualidade do milho foi avaliada em 870 amostras recém-colhidas (safras 2003 e 2004) utilizadas por indústrias processadoras de milho da Região Norte do Paraná. A amostragem foi realizada na recepção da indústria (n=300) e etapa de pré-secagem (n=135) de cada safra. *Fusarium* spp. apresentou 100% de frequência em ambas as safras, *Penicillium* spp. 90 e 95%, enquanto que *Aspergillus* spp. 6 e 15%, para 2003 e 2004, respectivamente. Fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) foi detectada em todas as amostras, com níveis variando de 0,02 a 11,83 mg/g em amostras de recepção e de 0,02 a 10,98 mg/g em amostras de pré-secagem. Fumonisina B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) foi detectada em níveis variando de 0,02 a 5,25 mg/g em amostras de recepção e de 0,01 a 7,89 mg/g em amostras de pré-secagem (safra 2003). As amostras da safra de 2004 apresentaram níveis de FB<sub>1</sub> variando de 0,03 a 12,04 mg/g em amostras de recepção da cooperativa e de 0,06 a 7,74 mg/g em amostras de pré-secagem. FB<sub>2</sub> foi detectada em níveis variando de 0,02 a 6,12 mg/g em amostras de recepção e de 0,05 a 3,47 mg/g em amostras de pré-secagem. Considerando 4,00 mg/g como nível máximo recomendado para consumo humano, 351 amostras (80,7%) da safra de 2003 e 430 amostras (98,8%) da safra de 2004 estariam adequadas ao processamento de massas. Níveis baixos de contaminação foram detectados em amostras de milho utilizadas como matéria-prima pelas empresas processadoras da Região Norte do Estado do Paraná, ratificando que o

constante monitoramento é essencial para produzir milho com qualidade fitossanitária adequada às recomendações comerciais. Paralelamente, foram comparadas as metodologias de análise por contagem de pontos de fluorescência, cromatografia em camada delgada (CCD) e espectrofluorimetria por meio da análise de 40 amostras de milho naturalmente contaminadas por aflatoxinas e positivas para *Aspergillus* do grupo *flavus*. As aflatoxinas foram detectadas por CCD em 16 amostras (40%), enquanto que por espectrofluorimetria 24 amostras foram positivas (60%). Os resultados de CCD e espectrofluorimetria apresentaram boa correlação ( $r=0,97$ ). A análise segundo contagem de pontos de fluorescência apresentou 20% de resultados falso-negativos, sugerindo seu emprego como triagem para seleção de lotes com possível contaminação por aflatoxinas.

**Palavras-chave:** Milho. Fumonisinias. *Fusarium* spp. CCD. Espectrofluorimetria. Contagem de pontos de fluorescência. Aflatoxinas.

## ABSTRACT

Corn is an important cereal crop in Brazil as a major ingredient of animal feed and as raw material included in more than 500 cereal based products. Nevertheless, due to its nutritional quality it becomes an excellent substratum for the toxigenic fungi contamination. In order to evaluate the effect of the time interval between the harvesting and the pre-drying step on the fungal and fumonisin contamination, 490 samples were collected in three points of the corn producing chain, field (n=100), delivery post (reception) of the cooperative (n=100) and pre-drying step (n=45) from two consecutive crops (2003 and 2004) of the North Region of Paraná State. The two crops showed a similar profile concerning the fungal frequency. *Fusarium* sp. was the prevalent genera (100%) for the three sampling sites from both crops, followed by *Penicillium* sp. which was detected in 98%, 95% and 97% of samples from field, reception and pre-drying step (2003 crop), respectively. Fumonisin were detected in all samples from the three points of producing chain belonging to both 2003 and 2004 crops. Fumonisin levels ranged from 0.11 to 15.32 ug/g in field samples, from 0.16 to 15.90 ug/g in reception samples and from 0.02 to 18.78 ug/g in pre-drying samples belonging to 2003 crop. Samples from 2004 crop showed lower contamination and fumonisin levels ranged from 0.07 to 4.78 ug/g in field samples, from 0.03 to 4.09 ug/g in reception samples and from 0.11 to 11.21 ug/g in pre-drying samples. The mean fumonisin levels increased gradually from = 5.0 ug/g to 18.78 ug/g as the time interval between the harvesting and the pre-drying step increased from 3.2 to 8.9 hours (2003 crop). The same profile was observed for samples from 2004 crop. Fumonisin levels and the time interval ( $r=0.96$ ) showed positive correlation ( $p < 0.05$ ), suggesting that delay in drying process can increase fumonisin levels in corn. In addition, corn quality concerning to fungal and fumonisin contamination was evaluated in 870 freshly harvested corn samples (2003 and 2004) used as raw material by corn processing industries in the North region of Paraná State. Sampling was carried out in two points of corn producing chain, i.e., reception of processing industry (n=300) and pre-drying step (n=135) for each crop. Corn samples were frequently contaminated with *Fusarium* sp. (100%) and *Penicillium* sp. (90 to 95%), when compared to *Aspergillus* sp. (6 to 15%). Fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) was detected in all samples from the two points of corn producing chain belonging to both crops. FB<sub>1</sub> levels ranged from 0.02 to 11.83 mg/g in reception samples and from 0.02 to 10.98 mg/g in pre-drying samples belonging to 2003 crop. Samples from 2004 crop showed FB<sub>1</sub> levels ranging from 0.03 to 12.04 mg/g in reception samples and from 0.06 to 7.74 mg/g in pre-drying samples. FB<sub>2</sub> levels ranged from 0.02 to 5.25 mg/g in reception samples and from 0.01 to 7.89 mg/g in pre-drying samples (2003 crop), while in samples from 2004 crop FB<sub>2</sub> levels ranged from 0.02 to 6.12 mg/g in reception samples and from 0.05 to 3.47 mg/g in pre-drying samples. Considering 4.0 ug/g as the maximum fumonisin level recommended for pasta production, 351 samples (80.7%) from 2003 crop and 430 samples (98.8 %) from 2004 crop were safe for human consumption. Low fumonisin levels were detected in the most corn samples used as raw material by processing industries in the North region of Paraná State. Nevertheless, constant monitoring control regarding the throughout corn producing chain is essential for hazard minimization and compliance with trade requirements. Parallely, fluorescence point counting, thin layer chromatography (TLC) and spectrofluorimetry were compared through analysis of 40 naturally contaminated corn samples and positive for *Aspergillus flavus* group. Aflatoxins were

detected by TLC in 16 (40%) samples, while 24 (60%) samples were positive by spectrofluorimetry. Data obtained by TLC and spectrofluorimetry showed a good correlation ( $r=0,97$ ). Analysis by fluorescence point counting showed 20% of false-negative results, suggesting its application on screening of sample lots possibly contaminated by aflatoxins.

**Keywords:** Corn. Fumonisin. *Fusarium* spp. TLC. Spectrofluorimetry. Fluorescence point counting. Aflatoxins.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Fluxograma de beneficiamento de milho até armazenagem dos grãos no silo	19
<b>Figura 2</b> – Estrutura química das principais fumonisinas naturalmente encontradas em milho e derivados	23
<b>Figura 3</b> – Estrutura da fumonisina B <sub>1</sub> e das bases esfingóides, esfingosina e esfinganina	26
<b>Figura 4</b> – Mecanismo de ação da Fumonisina B <sub>1</sub> em relação à síntese de esfingolipídios (WANG <i>et al.</i> , 1991)	27
<b>Figura 5</b> – Via proposta para biossíntese de fumonisinas. R1 (TCA) ácido tricarbóxico. Genes envolvidos: [A] fum 1, [B] fum 2 e [C] fum 3 (PROCTOR <i>et al.</i> , 1999)	32
<b>Figura 6</b> – Mecanismo de ação tóxica do Aflatoxin-8,9 epóxido sobre o DNA	37
<b>Figura 7</b> – Via biossintética de aflatoxinas e esterigmatocistina (SWEENEY & DOBSON, 1999)	40
<b>Figura 8</b> – Fluxograma dos pontos de coleta das amostras	51
<b>Figura 9</b> – Fluxograma da amostragem segundo os pontos de coleta	52
<b>Figura 10</b> – Fluxograma da classificação de milho adotada pelas cooperativas	53
<b>Figura 11</b> – Fluxograma para contagem de bolores e leveduras em amostras de milho	54
<b>Figura 12</b> – Fluxograma de extração de fumonisinas, segundo Shephard <i>et al.</i> (1990) modificado por Ueno <i>et al.</i> (1993)	55
<b>Figura 13</b> – Fluxograma da etapa de pré-limpeza do extrato bruto por coluna de troca iônica forte	56
<b>Figura 14</b> – Fluxograma de quantificação de fumonisinas por CLAE segundo Shephard <i>et al.</i> (1990) modificado por Ueno <i>et al.</i> (1993)	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Área plantada, produtividade e produção nacional e paranaense referente às safras 1990/91 a 2005/06.....	17
<b>Tabela 2</b> – Padrão de classificação do milho adotado por empresas que comercializam rações para avicultura e suinocultura (MENEGAZZO <i>et al.</i> ,(2002) .....	20
<b>Tabela 3</b> – Massa molecular e fórmula molecular das principais fumonisinas ....	24
<b>Tabela 4</b> – Efeito agudo da fumonisina B <sub>1</sub> em várias espécies animais .....	30
<b>Tabela 5</b> – Propriedades físicas e químicas das aflatoxinas.....	35
<b>Tabela 6</b> – Doses agudas de aflatoxinas em animais .....	37
<b>Tabela 7</b> – Efeitos específicos causados por aflatoxinas em diferentes espécies animais.....	38

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1 Milho.....	16
2.2 <i>Fusarium verticillioides</i> efumonisinias .....	20
2.2.1 <i>Fusarium verticillioides</i> .....	20
2.2.2 Fumonisinias .....	22
2.3 <i>Aspergillus flavus</i> e aflatoxinas .....	32
2.3.1 <i>Aspergillus flavus</i> .....	32
2.3.2 Aflatoxinas.....	33
2.4 Fatores que afetam a produção de micotoxinas.....	41
2.5 Ocorrência natural de fumonisinias e aflatoxinas.....	46
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	50
3.1 OBJETIVO GERAL.....	50
3.2 OBJETIVO ESPECIFICO .....	50
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	51
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	58
ARTIGO A: <b>Effect of time interval from harvesting to pre-drying step on natural fumonisin contamination in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil.</b> .....	60
ARTIGO B: <b>Mycotoxicological quality evaluation of corn samples used by processing industries in the Northern region of Paraná State, Brazil</b> .....	75
ARTIGO C: <b>Comparação de metodologias cromatografia em camada delgada (ccd), espectrofluorimetria e análise por contagem de pontos de fluorescência para detecção de aflatoxinas em milho.</b> .....	91
<b>CONCLUSÕES</b> .....	102
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	103

## 1 INTRODUÇÃO

A agropecuária constitui a base da economia brasileira, garantindo o fornecimento contínuo de insumos de origem vegetal e animal, sendo que o Estado do Paraná ocupa posição estratégica pela maior produção de milho, outros grãos, frutas e produtos de origem animal.

O cenário mundial atual é favorável para o Brasil se consolidar como um dos grandes exportadores agrícolas do mundo, sendo que em 2007, a produção total de cereais, leguminosas e oleaginosas deve alcançar 132,36 milhões de toneladas e ficar 1,46% acima das 130,45 milhões de toneladas obtidas em 2006 (CONAB, 2007). As exportações brasileiras de milho nos dois primeiros meses de 2006 atingiram 1,214 milhões de toneladas, volume 68% superior ao registrado em igual período de 2005, de acordo com dados da Secretaria de Comércio Exterior (Secex). O Brasil exportou 587 mil toneladas de milho em janeiro/2006 e embarcou mais 622 mil toneladas em fevereiro/2006, sendo a maior parte pelo porto de Paranaguá - PR.

No Paraná, maior produtor nacional de milho, estima-se uma produção de 11,43 milhões de toneladas em 2007. O destaque em janeiro foi justamente no setor agrícola, com a comercialização de milho e trigo. Em relação ao mesmo mês de 2005, as vendas do milho cresceram mais de cinco vezes, elevando-se de US\$ 9,39 milhões para quase US\$ 52 milhões (CONAB, 2007).

O milho, uma importante fonte nutricional, constituindo um considerável componente da alimentação humana e representando 60 a 70% da composição das rações empregadas na suinocultura e avicultura está sujeito à contaminação por fungos, produtores de metabólitos secundários que reduzem a qualidade do produto. Nas duas últimas décadas, a qualidade sanitária e nutricional dos grãos de milho passou a ser alvo de preocupação para os produtores, armazenadores, processadores, exportadores e consumidores.

A qualidade do milho é fundamental para se estabelecer o preço de comercialização. O grão de milho é classificado de acordo com os fatores de qualidade tais como umidade, impurezas, grãos ardidos, brotados, e matérias estranhas. As alterações podem ocorrer em qualquer etapa da cadeia produtiva, ou seja, no desenvolvimento, maturação, colheita, transporte, secagem e armazenamento. Os fatores que mais afetam a qualidade estão relacionados com



condições climáticas de cultivo, colheita e armazenagem.

Entre os diversos fungos envolvidos na fase de pós-colheita de milho, *Fusarium verticillioides* é relevante, sendo que a sua viabilidade se estende durante o armazenamento. Esse fungo é responsável pela produção de metabólitos secundários tóxicos do grupo das fumonisinas, que causam uma série de efeitos tóxicos ao homem e animais domésticos, com destaque para leucoencefalomalácia em eqüídeos, síndrome de edema pulmonar em suínos, imunossupressão em aves e atividade promotora de câncer comprovada em ratos (NORRED; VOSS, 1994).

Face à ocorrência praticamente inevitável de *Fusarium verticillioides* e os subseqüentes riscos associados à presença de fumonisinas em milho, estudos dirigidos para o ponto crítico da produção de fumonisinas, micotoxinas mais freqüentemente detectadas em milho, são importantes. Portanto, o monitoramento de toda cadeia produtiva é imprescindível, uma vez que o processamento industrial não elimina as toxinas existentes nos grãos de milho.

Um dos pontos de afunilamento detectado na cadeia produtiva do milho está na impossibilidade das empresas controlarem a presença de micotoxinas em todos os lotes recebidos devido ao alto custo das análises. Por outro lado, a inexistência de silos e secadores nas propriedades rurais resulta na permanência dos grãos colhidos por longos períodos com um teor de umidade favorável ao desenvolvimento de fungos toxigênicos. Estudos anteriores demonstraram que nessas fases, a contaminação por fumonisinas pode aumentar em até 10 vezes, prejudicando a qualidade do produto.

As crescentes exigências dos mercados interno e externo quanto a garantias de qualidade e sanidade de produtos alimentares têm obrigado a implementação de processos de certificação e rastreabilidade. Os mercados importadores de aves e suínos começam a exigir esta certificação dos produtos baseada na rastreabilidade das matérias primas empregadas na alimentação desses animais. No caso de grãos, micotoxinas e contaminantes fitossanitários podem constituir barreiras para a comercialização.

A globalização exige qualidade total ao longo de toda a cadeia produtiva. A preocupação existente entre os produtores quanto à manutenção da qualidade de milho, na etapa pós-colheita, vem se tornando cada vez mais crítica. Portanto, o conhecimento de toda cadeia produtiva é importante para concentrar esforços nos pontos de controle e para garantir a qualidade e segurança alimentar.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MILHO

Trata-se de uma cultura mundial com produção anual de 607,1 milhões de toneladas. Os Estados Unidos da América detêm a maior produção mundial com quase 50%, seguido pela China e Brasil. A produção brasileira alcançou franca expansão nos últimos 15 anos, com produção de 24,09 milhões de toneladas no ano de 1990/91 para cerca de 41,37 milhões de toneladas em 2005 (crescimento de 73%). O Estado do Paraná é o principal produtor e exportador representando 30% da produção nacional em 2005. A evolução na produção paranaense é maior que a evolução nacional no mesmo período analisado (de 1990/91 a 2005/06), sendo que a produção paranaense aumentou 107%, passando de 4,96 milhões de toneladas para 10,29 milhões de toneladas no ano de 2005/06 (CONAB, 2007) (Tabela1).

O milho (*Zea mays* L.), um cereal classificado como pertencente à família das *Gramíneae* e subdividido em tribos. A tribo *Maydeae* engloba oito gêneros, sendo três de origem americana, denominados de *Zea*, *Tripsacum* e *Euchlaena*. O gênero *Zea* destaca-se pela importância econômica e social, o *Tripsacum* devido ao uso como forragem e o *Euchlaena* por ser precursor do milho (SOTOMAYOR-RIOS; WEIBEL, 1987). O gênero *Zea*, por sua vez, subdivide-se em cinco grupos, denominados de amiláceo, dentado, duro, pipoca e doce. O híbrido semidentado, originado do cruzamento entre o milho duro e o dentado, é o mais aceito no Brasil, predominando nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina.

**Tabela 1** – Área plantada, produtividade e produção nacional e paranaense de milho referente às safras 1990/91 a 2005/06.

Safras	Brasil			Paraná		
	Área Plantada (1000 hect.)	Produtividade (Kg/hect.)	Produção (1000 ton.)	Área Plantada (1000 hect.)	Produtividade (Kg/hect.)	Produção (1000 ton.)
1990/91	13.451,4	1.791,0	24.096,1	2.363,0	2.103,0	4.968,9
1991/92	14.027,1	2.194,0	30.771,2	2.600,0	2.824,0	7.342,5
1992/93	12.436,3	2.349,0	29.207,7	2.689,0	2.886,0	7.760,6
1993/94	14.151,7	2.344,0	33.173,7	2.881,0	2.822,0	8.129,4
1994/95	14.282,2	2.622,0	37.441,9	2.750,0	3.338,0	9.180,0
1995/96	13.756,7	2.356,0	32.404,7	2.440,5	3.243,0	7.914,8
1996/97	13.798,8	2.588,0	35.715,6	2.525,0	3.233,0	8.164,9
1997/98	11.391,1	2.650,0	30.187,8	2.254,4	3.284,0	7.403,9
1998/99	12.513,0	2.589,0	32.393,4	2.549,2	3.319,0	8.460,0
1999/00	12.757,9	2.480,0	31.640,5	2.668,3	2.638,0	7.037,0
2000/01	12.972,5	3.260,0	42.289,7	2.797,0	4.424,0	12.374,0
2001/02	12.297,8	2.868,0	35.266,8	2.492,5	3.757,0	9.363,0
2002/03	13.226,2	3.585,0	47.410,9	2.805,8	4.867,0	13.657,0
2003/04	12.783,0	3.286,0	42.128,5	2.447,1	4.574,0	11.192,0
2004/05	12.025,7	2.902,0	34.976,9	1.969,1	4.238,0	8.344,0
2005/06 *	12.490,8	3.307,0	41.370,0	2.113,7	4.863,0	10.294,0
2006/07**	12.997,2	3.443,0	44.681,0	2.386,4	4.793,0	11.437,3

**Fonte:** CONAB- levantamento realizado em janeiro de 2007.

Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA

Companhia Nacional de Abastecimento.

\* Preliminar \*\* Previsão.

Ton - tonelada , Hect. - hectare

Segundo estimativa da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2007) a produtividade paranaense será de 4,79 ton/hectare na safra 2006/2007, cerca de 1,35 ton/hectare maior que a média nacional. Com relação à área plantada, o Paraná representa apenas 17% da área nacional, mas com produção de 25,6% do total da safra de milho.

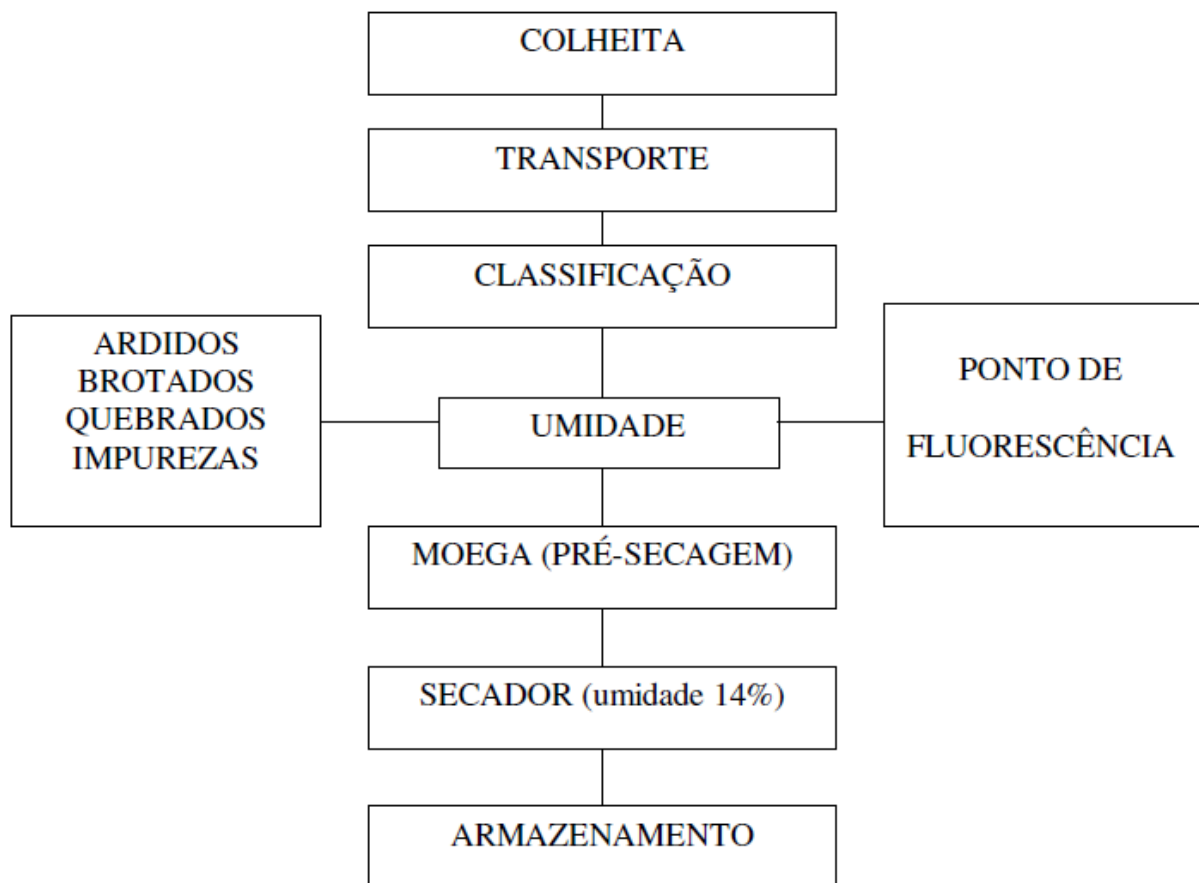
Consiste em matéria-prima de alta qualidade nutricional, apresentando altos teores em carboidratos (71,7%), proteínas (9,5%) e lipídios (4,3%). Suas proteínas apresentam alto valor nutritivo, que aliado à composição de micronutrientes, torna-o o principal ingrediente nas rações animais. Com relação à alimentação humana, destina-se a produtos processados, incluindo cereais matinais, "snacks", "cornflakes", semolina, massas e biscoitos (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997).

Estima-se que nos países desenvolvidos, o consumo anual de grãos

seja de 1000 kg/ano, sendo 930 kg consumidos na forma de ração para produção de carne, leite e ovos e, somente 70 kg na forma de dieta humana. Por outro lado, em países subdesenvolvidos da África e Ásia, o consumo *per capita* é de 150 kg/ano, quase todo na forma de grão "*in natura*" (MORICCHI *et al.*, 1989).

Devido à produção de milho restringir-se a um curto período e o abastecimento ocorrer durante todo o ano, é importante a prática da conservação. Por ser uma estrutura viva, o grão tende a se deteriorar por processos naturais como a respiração que consome matéria seca. Outro fator que acelera a deterioração é a presença de microrganismos, principalmente quando o grão é estocado de forma imprópria com elevado teor de água livre, impurezas, grãos danificados por fungos (LÁZZARI *et al.*, 1997).

Após a colheita, o milho é transportado até a unidade beneficiadora onde ocorre o processo de pré-limpeza (retirada de impurezas, grãos ardidos, brotados, trincados), pesquisa de pontos de fluorescência e determinação de umidade. Por tais parâmetros, o milho é classificado como aceitável ou não e prossegue para armazenagem pré-secagem em estruturas denominadas moegas. Por intermédio de esteiras mecânicas, o milho é então transportado para secadores, cuja finalidade é reduzir a umidade relativa do grão para valores de 14%. Todo este processo integrado (Figura 1) caracteriza-se como beneficiamento do milho em etapas pós-colheita (MENEGAZZO *et al.*, 2001).



**Figura 1** – Fluxograma de beneficiamento de milho até armazenagem dos grãos no silo.

Quanto à classificação, o grão de milho é inspecionado de acordo com a presença de impurezas, restos de cultura, grãos quebrados, trincados, ardidos e presença de micotoxinas. Os principais parâmetros de classificação adotados por empresas que comercializam rações para avicultura e suinocultura estão listados na tabela 2 (MENEGAZZO *et al.*, 2001).

**Tabela 2** – Padrão de classificação do milho adotado por empresas que comercializam rações para avicultura e suinocultura (MENEGAZZO *et al.*, 2001)

<b>Parâmetros</b>	<b>Tolerância máxima</b>
Umidade	14 %
Impurezas	1 %
Ardidos + brotados	6 %
Quirera	2 %
Carunchados	2 %
Aflatoxina	20 µg/kg
Ocratoxina	20 µg/kg
Fumonisina	8 µg/kg
Toxina T-2	400 µg/kg
Zearalenona	500 µg/kg
Vomitoxina	2000 µg/kg

## 2.2. *FUSARIUM VERTICILLIOIDESE FUMONISINAS*

### 2.2.1 *Fusarium Verticillioides*

O milho, devido à sua elevada qualidade nutricional, está sujeito à contaminação por uma microbiota muito diversificada entre bactérias, leveduras e bolores. Segundo Christensen e Sauer (1982), os fungos contaminantes de grãos podem ser classificados quanto ao requerimento de água em fungos de campo e fungos de armazenamento. Os fungos de campo são caracterizados por invadirem os grãos no estágio pré-colheita, ou nas espigas pós-colheita antes do debulhamento. Requerem um alto teor de umidade (20-21%) e incluem os gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium* e *Fusarium*. Os fungos de

armazenamento, por sua vez, requerem teor de umidade na faixa de 16% e compreendem os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.

Os fungos de maior interesse são os produtores de metabólitos secundários tóxicos, como os gêneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Alternaria* (ONO *et al.*, 1999; CASTELLÁ *et al.*, 1999; SWEENEY; DOBSON, 1999; GONZALEZ *et al.*, 2001; CREPPY, 2002).

*F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (*F. moniliforme* Sheldon), um patógeno primário endofítico de milho, infecta raízes, colmo e espigas, causando podridão em todos os estádios de desenvolvimento do milho (FANDOHAN *et al.*, 2004; YATES *et al.*, 2005). Está entre os fungos comumente associados ou colonizando plantas de maneira assintomática (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997). O ciclo da fusariose, infecção do vegetal por *Fusarium*, inicia-se com a sobrevivência do fungo nos resíduos de cultivos anteriores, e permanece na forma de hifas capazes de contaminar sementes no solo, seguida da disseminação sistemática para o colmo até atingir a espiga. Outra via de contaminação é a disseminação de macro e microconídios pelo ar ou pela chuva, através do estigma da espiga. Os conídios introduzidos nos tecidos por via sistêmica atingem os grãos, porém o estigma constitui a via de inoculação mais direta. Outro processo que favorece a fusariose é a transmissão por meio de insetos vetores de conídios, que também provocam injúrias na planta, tornando o local adequado para a instalação e germinação de conídios (NELSON *et al.*, 1991; DESJARDINS *et al.*, 1994; LÁZZARI, 1997; BAKAN *et al.*, 2002; GUTLEB *et al.*, 2002). *Fusarium verticillioides* apresenta ampla distribuição, mas é encontrado principalmente em regiões tropicais e subtropicais, contaminando produtos como milho, arroz, cana-de-açúcar, bananas, aspargos e algodão (THRANE; SEIFERT, 1989; GUTLEB *et al.*, 2002).

*Fusarium verticillioides* causa prejuízos em culturas de milho advindos da descoloração e necrose dos grãos, perda de matéria seca (EZZAT, 1998) e da produção de fumonisinas, podendo levar à inviabilização de todo o lote por apresentar riscos à saúde animal e humana (ALBERTS *et al.*, 1990; EZZAT, 1998; GUTLEB *et al.*, 2002).

*Fusarium verticillioides* apresenta colônias de rápido crescimento (três a cinco centímetros de diâmetro, em 4 dias a 25 °C) e colorações variadas (rosa, laranja, vermelho-escuro, violeta e lilás). Possui micélio aéreo cotonoso e difuso, microconídeos em longas cadeias e macroconídeos fusiformes,

característicos do gênero. A temperatura ótima de crescimento está na faixa de 22,5 a 27,5 °C, sendo a temperatura mínima de 2,5 a 5,0 °C e máxima de 37,5 °C. A espécie pode crescer sob condições anaeróbicas e suportar concentrações acima de 15% de NaCl em meio de cultura (THRANE; SEIFERT, 1989).

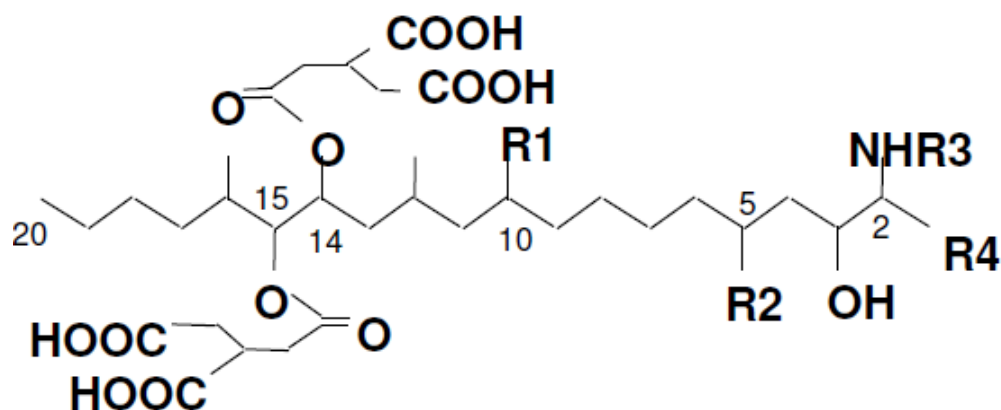
### 2.2.2 Fumonisinias

Micotoxinas são compostos orgânicos de baixo peso molecular, produzidos como metabólitos secundários tóxicos, por espécies de diferentes gêneros fúngicos, com diversificadas estruturas químicas e que ocorrem em uma variedade de substratos, incluindo produtos agrícolas (DIAZ *et al.*, 1994; DILKIN *et al.*, 2002b). As cinco principais micotoxinas encontradas em cereais e derivados são ocratoxina A, zearalenona, tricotecenos, aflatoxinas e fumonisinias (FONSECA *et al.*, 1996).

As fumonisinias constituem um grupo de micotoxinas descobertas por Gelderblom *et al.* (1988) em cultura de *F. verticillioides* MRC 828 (MARASAS, 2001). Além de *F. verticillioides*, outras espécies como *F. proliferatum* e *F. nygamai* também são produtoras de fumonisinias (NELSON *et al.*, 1993). Até 2006, 28 análogos estruturais foram identificados e subdivididos em quatro grupos designados pelas letras A, B, C e P (RHEEDER *et al.*, 1995; AH-SEO; WON LEE, 1999), entretanto apenas a FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> e FB<sub>3</sub> foram detectadas em níveis significativos em milho e derivados naturalmente contaminados (THIEL *et al.*, 1991; CASTELLÁ *et al.*, 1999; LA CAMPA *et al.*, 2004). A fumonisina B<sub>1</sub> é a mais abundante, correspondendo a cerca de 70% do total de fumonisinias (NELSON *et al.*, 1991; DESJARDINS *et al.*, 2000).

As análises de ressonância nuclear magnética e espectrometria de massa revelaram que a fumonisina B<sub>1</sub> é um diéster de propano 1, 2, 3 -ácido tricarbóxico e 2 - amino - 12, 16 dimetil - 3, 5, 10, 14, 15 - pentahidroieicosano onde nos C<sub>14</sub> e C<sub>15</sub> os grupos hidroxilas são esterificados com o grupo carboxiterminal de propano 1, 2, 3 - ácido tricarbóxico (BEZUIDENHOUT *et al.*, 1988) (Figura 2).





	R1	R2	R3	R4
<b>FB<sub>1</sub></b>	<b>OH</b>	<b>OH</b>	<b>H</b>	<b>CH<sub>3</sub></b>
<b>FB<sub>2</sub></b>	<b>H</b>	<b>OH</b>	<b>H</b>	<b>CH<sub>3</sub></b>
<b>FB<sub>3</sub></b>	<b>OH</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>CH<sub>3</sub></b>
<b>FB<sub>4</sub></b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>CH<sub>3</sub></b>

**Figura 2** – Estrutura química das principais fumonisinas naturalmente encontradas em milho e derivados.

As fumonisinas apresentam apenas quatro elementos em sua estrutura (C, N, H e O), são moléculas de baixo peso molecular, variando entre 689 a 721 (tabela 4), com fórmula molecular geral  $C_{34}H_{59}NO_n$ . Possuem característica fortemente polar, uma vez que constituem um grupo de poliálcoois e devido à facilidade em formar pontes de hidrogênio com a água, apresentam boa solubilidade em metanol:água e acetonitrila:água, sendo insolúveis em compostos de baixa polaridade, como diclorometano e hexano (BEZUIDENHOUT *et al.*, 1988). Não apresentam grupos cromóforos, e também não absorvem a luz ultravioleta.

**Tabela 3** – Massa molecular e fórmula molecular das principais fumonisinas.

Fumonisinias	Fórmula	Massa Mol. (g/mol)	Ponto fusão (°C)
FB <sub>1</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>15</sub>	721,8	105,2
FB <sub>2</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>14</sub>	705,8	105,4
FB <sub>3</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>14</sub>	705,8	104,5
FB <sub>4</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>13</sub>	689,8	104,2

Fonte: Fonseca, 2005.

Quanto às propriedades físicas, a fumonisina B<sub>1</sub> apresenta-se sob a forma de um pó branco, higroscópico, com ponto de fusão entre 103 e 105 °C. São termo-resistentes, uma vez que a fumonisina B<sub>1</sub> foi degradada em apenas 50% quando submetida a relações temperatura-tempo: 75 °C/8h, 100 °C/75 minutos, 125 °C/38 minutos e 150 °C/10 minutos (DUPUY *et al.*, 1993).

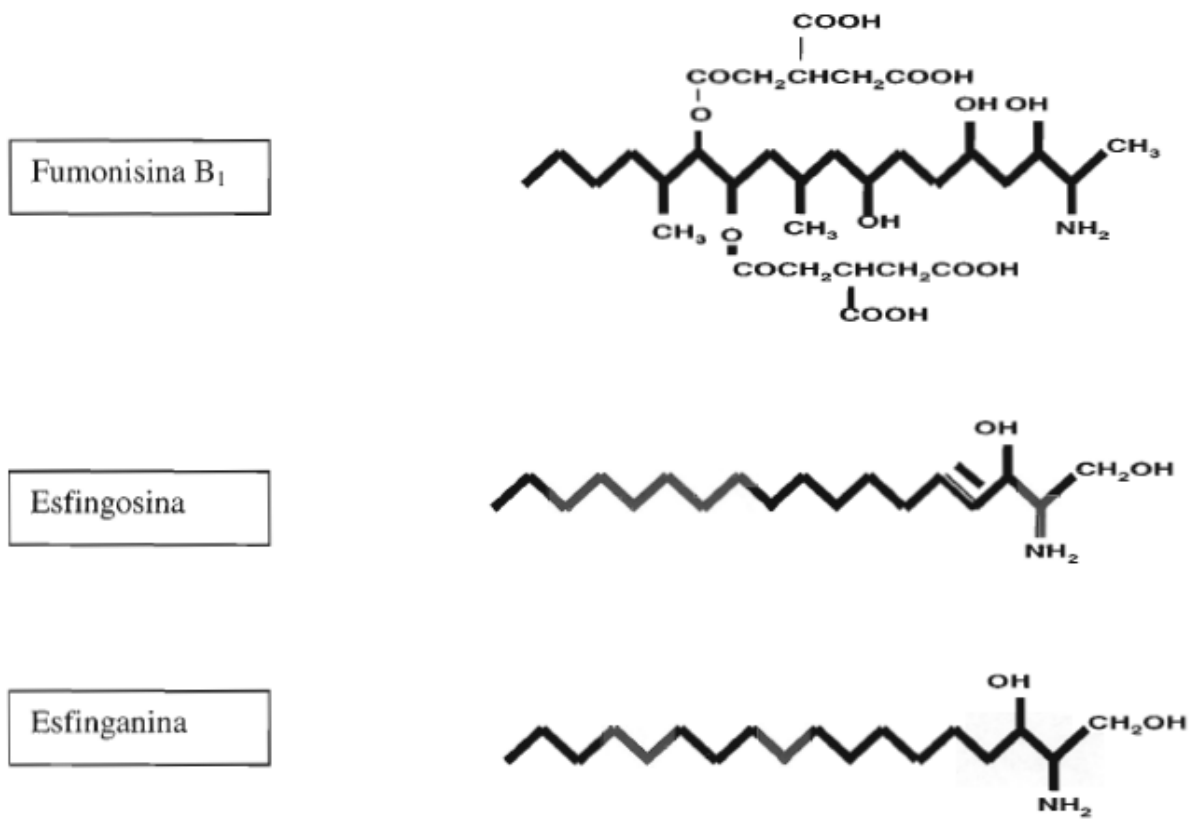
A fumonisina B<sub>1</sub> não é completamente destruída durante o processamento dos alimentos, como por exemplo, a fermentação de milho contaminado para produção de bebidas (DESJARDINS *et al.*, 2000) ou por nixtamalização, um processo onde o milho é fervido em solução cálcica para produzir iguarias mexicanas denominadas "tortillas" (LA CAMPA *et al.*, 2004).

As principais metodologias aplicadas para a detecção e quantificação de fumonisina B<sub>1</sub> e seus análogos incluem cromatografia em camada delgada (CCD) (PLATTNER *et al.*, 1990), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ALBERTS *et al.*, 1990; ROSS *et al.*, 1991; SHEPHARD *et al.*, 1990) e cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (SYDENHAM *et al.*, 1990). Na década de 90 surgiram metodologias baseadas em ensaios imunoenzimáticos, empregando principalmente anticorpos monoclonais com alta especificidade (STROKA *et al.*, 2000).

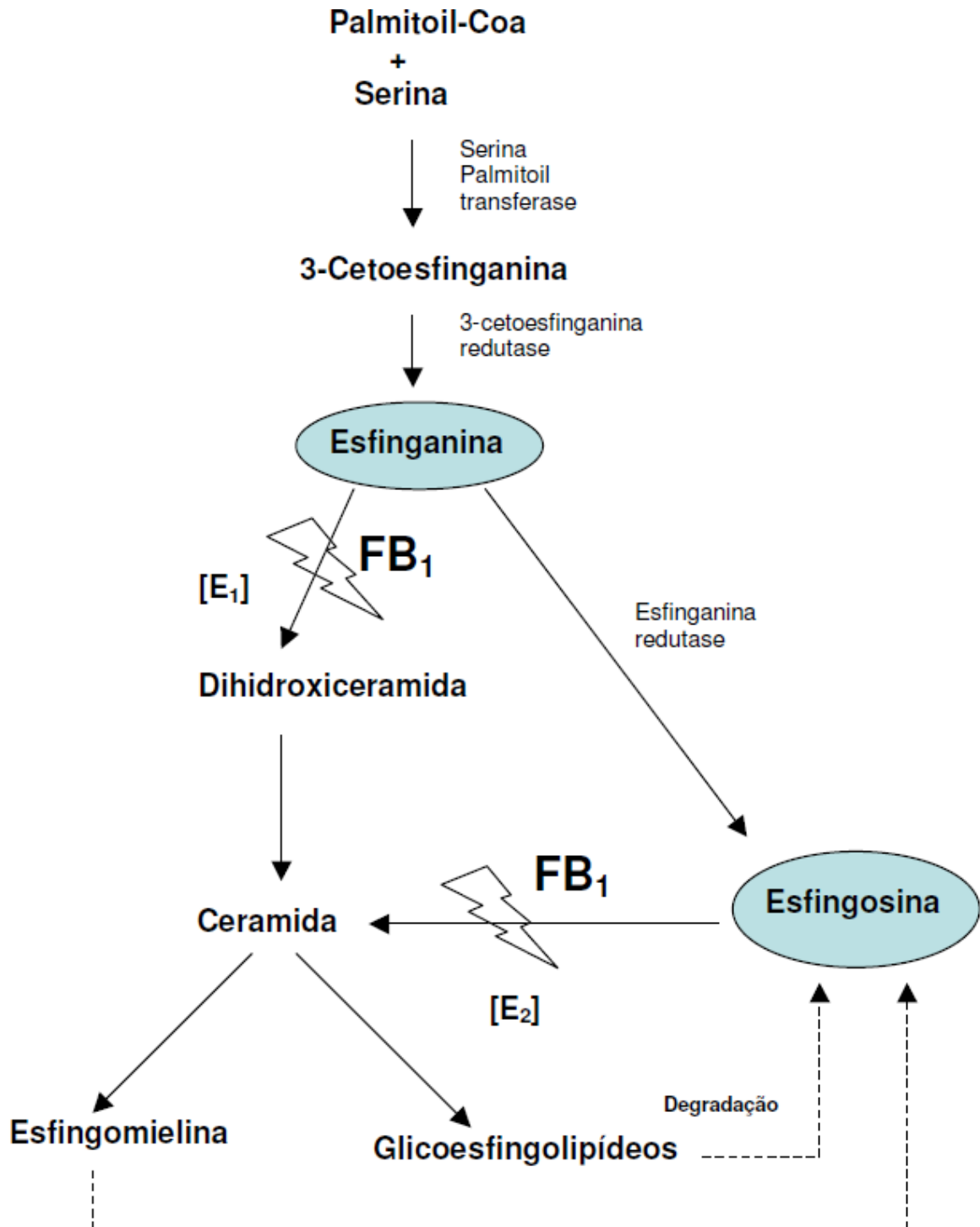
Apesar da descoberta de metodologias mais sensíveis e precisas, pouco tem sido realizado em termos de definição de limites aceitáveis padronizados para todos os países, quer sejam importadores ou exportadores de milho e derivados. Existem apenas recomendações como a estabelecida pelo "Mycotoxin Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians", recomendando um limite máximo de 5, 10, 50 e 50 µg/g de fumonisina para rações de eqüinos, suínos, bovinos e aves, respectivamente (MUNKVOLD; DESJARDINS,

1997). A "Food and Drug Administration" (FDA, 2001) recomenda para o consumo humano o nível máximo de 2,0 ug/g de fumonisinas (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub> + FB<sub>3</sub>) para farelos de milho, 3,0 ug/g para milho pipoca e 4,0 ux/g para milho destinado à produção de massas (AVANTAGGIATO *et al.*, 2002). Órgãos sanitários suíços recomendam o limite máximo de 1 ug/g para os derivados de milho destinados ao consumo humano (VISCANTI; BOENKE, 1995). Em 2001, a FAO/WHO, Expert Committee on Food Additives and Contaminants (JECFA, 1996) estabeleceu um máximo diário tolerável de caráter provisório para fumonisina de 2,0 ug/kg de peso corpóreo por dia.

Segundo Wang *et al.* (1991), o mecanismo de ação da fumonisina B<sub>1</sub> está relacionado à sua similaridade estrutural com os esfingolipídeos (esfinganina e esfingosina) (figura 3), resultando em inibição competitiva da enzima ceramida-sintetase (N-acil-transferase). Portanto, a fumonisina B<sub>1</sub> ocuparia o sítio ativo da enzima, bloqueando a síntese de ceramida, uma precursora de esfingomielina e glicosfingolipídeos (figura 5). Este bloqueio resulta no acúmulo tóxico de esfinganina livre e depleção de esfingolipídeos complexos, importantes lipídeos de membrana celular (JINDAL *et al.*, 1999). A esfinganina livre aparece no sangue e urina de animais que ingeriram fumonisina, podendo ser usada como biomarcador para a exposição (NORRED; VOSS, 1994). A fumonisina também age nos sítios de regulação celular, aparentemente independente da inibição do metabolismo lipídico, alterando a proliferação e a comunicação celular, adesão, apoptose, indução de estresse oxidativo e modulação de expressão gênica (ABADO-BECOGNEE *et al.*, 1998).



**Figura 3** – Estrutura da fumonisina B<sub>1</sub> e das bases esfingóides, esfingosina e esfinganina



**Figura 4** – Mecanismo de ação da Fumonisina Bi em relação à síntese de esfingolipídios

**Fonte:** Wang *et al.*, 1991.

[E<sub>1</sub>] e [E<sub>2</sub>] - N-acil transferase (ceramida sintetase).

Diferentes espécies animais apresentam graus variados de sensibilidade à fumonisina, dependendo da dose ingerida, estado nutricional do

animal e modo de exposição. Entre os animais mais sensíveis estão os eqüinos, acometidos por uma síndrome clássica de intoxicação conhecida por leucoencefalomalácia eqüina - LEME (MARASAS *et al.*, 1988; ROSS *et al.*, 1990; THIEL *et al.*, 1991; DESJARDINS *et al.*, 2000; LA CAMPA *et al.*, 2004). Surtos em vários países, incluindo Brasil, Argentina, África do Sul, China e Estados Unidos (HIROOKA *et al.*, 1990; WILSON *et al.*, 1990). A LEME consiste de uma doença de alta letalidade e mortalidade, sendo os sintomas clínicos mais evidentes a inapetência, a letargia, o movimento em pedalada, convulsão e morte (KELLERMAN *et al.*, 1990).

Em suínos, a fumonisina causa a síndrome de edema pulmonar (SEP) e hidrotórax (ROSS *et al.*, 1990), sendo o quadro sintomatológico reproduzido pela inoculação intravenosa de fumonisina B<sub>1</sub> (HARRISON *et al.*, 1990). Esta síndrome caracteriza-se por alterações hepáticas, cardiovasculares e pulmonares (HASCHEK *et al.*, 2001). O quadro clínico geral consiste de dispnéia, inapetência e morte dentro de poucos dias (OSWEILER *et al.*, 1992).

Em ratos, apresenta atividade hepatotóxica e promotora de câncer hepático, ocasionando o surgimento de lesões necrosantes nos lóbulos hepáticos, alterações dos hepatócitos em nível nuclear, como picnose, hiperplasia, proliferação do ducto biliar e fibrose (NORRED; VOSS, 1994). Efeitos similares foram observados por Gelderblom *et al.* (1988), que relataram redução de peso em ratos alimentados com ração contaminada por FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> e FB<sub>3</sub>. Gelderblom *et al.* (2001) através de estudos de proliferação de hepatócitos mostrou que a fumonisina B<sub>1</sub> poderia agir na fase de promoção de hepatocarcinomas em ratos. Esta ação estaria relacionada ao efeito hepatotóxico e ao aumento da lipoperoxidação (MILLER *et al.*, 1995) que a fumonisina B<sub>1</sub> promove, mostrando que o câncer é estabelecido quando uma substância genotóxica (como o DEN - dietilnitrosamina) age concomitantemente com a micotoxina.

Em aves, os efeitos se manifestam através do retardo no desenvolvimento, redução no ganho de peso, aumento de peso nos órgãos hepático e renal, problemas cardíacos, imunodepressão, degeneração e necrose hepática (WEIBKING *et al.*, 1993; NORRED; VOSS, 1994).

O consumo de milho contaminado com fumonisinas também tem sido relacionado com a ocorrência de câncer esofágico em humanos na África do Sul, China e outros países, onde este cereal constitui a dieta básica diária (THIEL *et*

*al.*, 1991; YOSHIZAWA *et al.*, 1994; MARASAS *et al.*; 1981). No Brasil, a região Sul se destaca com a mais alta incidência de câncer esofágico e também com o maior consumo de milho e derivados (VAN DER WESTHUIZEN *et al.*, 2003).

Estudos mais recentes têm mostrado que fumonisinas causam defeitos na formação do tubo neural em embriões de camundongos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (LA CAMPA *et al.*, 2004). Em 1990, foi relatada uma má formação do tubo neural em um grupo de recém-nascidos na fronteira entre Texas e México, onde o consumo de alimentos da culinária mexicana é maior, e acredita-se que tal patologia esteja associada com o consumo de "tortillas" (especialidade à base de milho) pelas mães durante a gravidez (MISSMER *et al.*, 2004).

Miller *et al.* (1995) demonstraram uma redução da viabilidade de células C6 de glioma induzida pela fumonisina B<sub>1</sub>, com atenuação do efeito lipoperoxidativo pela concomitante administração de vitamina E, demonstrando que grande parte de sua citotoxicidade advém da geração de radicais livres. Foi demonstrado que baixas concentrações (3 a 6 µM) de FB<sub>1</sub> embora não afetasse diretamente a viabilidade celular, bloqueava as fases G<sub>2</sub> e M do ciclo celular. Com respeito aos efeitos epigenéticos, os resultados obtidos mostram que a fumonisina B<sub>1</sub> induz uma hipermetilação significativa no DNA de células C6 de glioma em uma faixa de concentração que varia de 9 a 18 µM. Altas concentrações falharam ao induzir esta hipermetilação de DNA.

**Tabela 4** – Efeito agudo da fumonisina B<sub>1</sub> em várias espécies animais

<b>Espécie de animal</b>	<b>Principal efeito</b>	<b>Referência</b>
Bezerro	Lesão hepática	Osweiler <i>et al.</i> , 1993
Peixe	Morte, dano hepático	Lumlertdacha <i>et al.</i> , 1995
Galinha	Dano hepático	Ledoux <i>et al.</i> , 1992
Veado	Lesão cerebral	Howerth <i>et al.</i> , 1989
Asno	LEME*	Haliburton <i>et al.</i> , 1979
Pato	Crescimento reduzido	Vesonder <i>et al.</i> , 1992
Cavalo	LEME*	Kellerman <i>et al.</i> , 1990
Cordeiro	Morte, dano hepático/renal	Erdington <i>et al.</i> , 1995
Macaco	Resposta aterosclerótica	Fincham <i>et al.</i> , 1992
Camundongo	Dano hepático	Voss <i>et al.</i> , 1993
Porco	Morte, edema pulmonar	Harrison <i>et al.</i> , 1990
Pônei	LEME*	Wilson <i>et al.</i> , 1990
Rato	Dano hepático/renal	Voss <i>et al.</i> , 1993
Peru	Dano hepático/miocárdio	Weibking <i>et al.</i> , 1993
Levedura	Afeta metabolismo de esfingolipídios	Fonseca, 2005

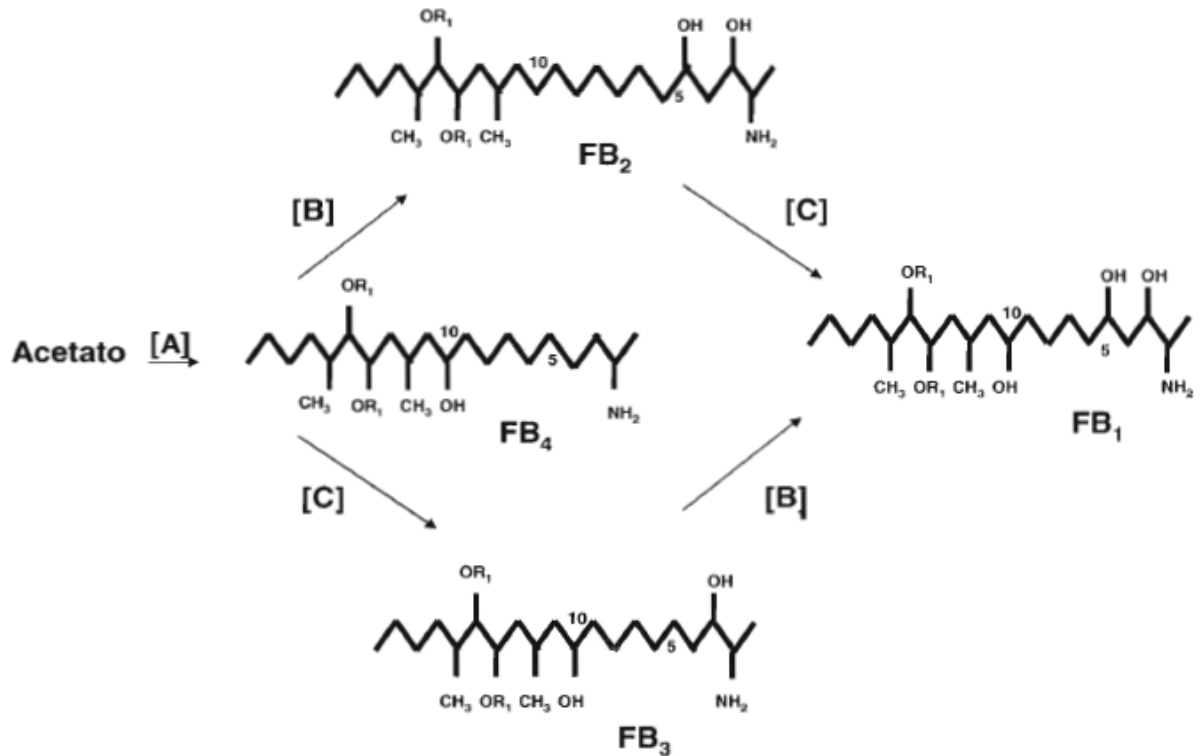
\* LEME \_ Leucoencefalomalácia equina

Em relação à biossíntese de fumonisinas, por meio de estudos avançados em biologia molecular foram identificados três *loci* relacionados com a síntese de fumonisina em *F. verticillioides*, denominados de *fum1*, responsável pelo controle da capacidade produtora da micotoxina, *fum2* e *fum3*, responsáveis pelo processo de hidroxilação nos C-10 e C-5, respectivamente (DESJARDINS *et al.*, 1995). Devido a sua semelhança estrutural com a molécula de esfingosina (figura4), supõe-se que as fumonisinas sejam sintetizadas pela mesma via metabólica da esfingosina. O processo de síntese inicia-se com a condensação de um grupo Acil-Coa com um aminoácido, tendo por catalisadora enzimas erina- palmitoiltransferase. Segundo Blackwell (1994), a incorporação de isótopos mostrou que o C- 1 e C-2 da



estrutura das fumonisinas originam-se da incorporação direta da alanina (principal precursor biossintético). O mesmo autor postulou que os carbonos C-3 ao C-20 poderiam estar relacionados com o acetato pela via ácido graxo sintetase, enquanto que o grupo hidroxila do C-4 poderia advir de uma molécula de hidrogênio dependente de hidroxilação. Para a síntese de FB<sub>4</sub> a partir de um ácido graxo, os carbonos C-14 e C-15 são oxigenados, sendo que a oxigenação continuada nos C-5 e C-10 produziria a FB<sub>3</sub>, a FB<sub>2</sub> e a FB<sub>1</sub>.

Desjardins *et al.* (1996) descobriram que os grupos metil do C-12 e C-16 são derivados da metionina e os átomos de oxigênio ligados à estrutura carbonada da molécula são oriundos da reação com o oxigênio molecular. A partir dessas descobertas a via biossintética das fumonisinas foi em parte elucidada, concluindo-se que a formação ocorre por condensação de moléculas estruturalmente simples, como os aminoácidos alanina e metionina com grupos acetato envolvidos na formação da estrutura carbonada. Forma-se, portanto, o análogo estrutural menos oxigenado (FB<sub>4</sub>) e por hidroxilações sucessivas o mais oxigenado, a fumonisina FB<sub>1</sub>. Por outro lado, Proctor *et al.* (1999) demonstraram por uma série de experimentos que a FB<sub>4</sub> é precursor apenas de FB<sub>2</sub>, e que FB<sub>3</sub> seria precursora primária de FB<sub>1</sub>, não estabelecendo qualquer possibilidade de conversão direta de FB<sub>2</sub> em FB<sub>1</sub> (Figura 5).



**Figura 5** – Via proposta para biossíntese de fumonisinas. R1 (TCA) ácido tricarbóxico. Genes envolvidos: [A] fum 1, [B] fum 2 e [C] fum 3

**Fonte:** Proctor *et al.*, 1999.

## 2.3 *ASPERGIUUS FLAVUSE* AFLATOXINAS

### 2.3.1 *Aspergillus Flavus*

O nome *Aspergillus* é derivado do termo latino "*aspergere*", que significa disseminar, sendo este fungo um dos mais ubíquos de todos os microrganismos (AL-DOORY; WAGNER, 1985).

Fungos do gênero *Aspergillus* desenvolvem-se em vegetais em decomposição ou em restos de matéria orgânica, e seus conídios são freqüentemente isolados do ar atmosférico. São considerados saprófitas, raramente agem como fungos patogênicos invadindo tecidos de hospedeiro normal, pois sua patogenicidade é limitada (NORDIN; LUCHESE, 1998).

*Aspergillus flavus* é caracterizado pelo crescimento rápido, com a colônia inicialmente velutínea, branca e pouco elevada, tornando-se pulverulento e

verde-amarelada (FONSECA, 2003). Micromorfológicamente apresenta conidióforos típicos sobre a trama de hifas septadas e ramificadas. Esse conidióforo é dilatado na extremidade, formando a vesícula. As fiálides originam-se diretamente da vesícula (unisseriado) ou de células estéreis intermediárias (métulas - bisseriado). As fiálides produzem conídios em sucessão, formando cadeias mais ou menos longas. A identificação dos grupos e espécies de *Aspergillus* é realizada pela observação de colônias em meio de Czapeck-Dox contendo 3% de sacarose, incubadas a 25 °C (LONDERO; CORTÊS, 1990).

Fungos do gênero *Aspergillus* são comuns em regiões tropicais e subtropicais, com elevada umidade e temperatura oscilando entre 15 e 30 °C (DILKIN *et al.*, 2002a). As condições ideais para o crescimento de *A. flavus* consistem de umidade ambiente de 18%, pH ótimo ligeiramente ácido, e temperatura entre 18 e 25 °C (HERRERA; ULLOA, 1990). *A. flavus* requer uma atividade de água mínima entre 0,78 e 0,80 para o crescimento e 0,83 a 0,87 para produção de toxina (GONCALVEZ *et al.*, 2001), sendo classificado como fungo de armazenamento, por requerer umidade relativa (16-18%) inferior a outros gêneros fúngicos (CHRISTENSEN; SAUER, 1982).

Os principais cereais contaminados por *Aspergillus* são as sementes oleaginosas, como a castanha, a castanha-do-Brasil, nozes, amendoim, semente de algodão, milho (DILKIN *et al.*, 2002b) e ocasionalmente frutas secas, como por exemplo, figos (THRANE e SEIFERT, 1989).

### 2.3.2 Aflatoxinas

As aflatoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (SWEENEY; DOBSON, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2002; FONSECA, 2003). Além de aflatoxinas, *A. flavus* e *A. parasiticus* podem produzir outros metabólitos secundários, como ácido oxálico, aspertoxina, ácido kójico, esterigmatocistina, ácido aspergílico, ácido beta-nitropropionico e uma substância de ação tremorgênica (FONSECA, 2003).

As aflatoxinas representam valor histórico, pois foram as primeiras micotoxinas que despertaram a comunidade científica para problemas de segurança

alimentar, quando na década de 60 foi relatada a morte de milhares de aves em criadouros no Reino Unido, levando a caracterizar o conjunto de sintomas como Síndrome da Doença X do peru. Posteriormente, experimentos comprovaram o envolvimento de um fungo, *Aspergillus flavus*, na etiologia da doença e por meio de ensaios foram isoladas as micotoxinas da ração à base de farelo de amendoim, denominadas aflatoxinas (toxinas de *A. flavus*) (NORRED, 2000).

Aflatoxinas são encontradas em cereais oleaginosos, com elevados teores de carboidratos e/ou lipídeos, como por exemplo: amendoim, milho, semente de algodão, além de frutas como castanhas, nozes, figo, côco seco (NILÜFER; BOYACIOGLU, 2002).

Cerca de 20 análogos estruturais de aflatoxinas são conhecidos, porém os naturalmente encontrados são B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (SWEENEY; DOBSON, 1999; STROKA *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2002). As aflatoxinas apresentam em comum um núcleo central cumarínico unido a uma molécula bifuranóide (SWEENEY; DOBSON, 1999), mas diferem quanto ao anel ciclopentano, presentes nas aflatoxinas B e um anel lactona nas aflatoxinas do grupo G.

Embora quimicamente semelhantes, apresentam diferentes graus de atividade biológica. A AFB<sub>1</sub> apresenta maior toxicidade, além de ser a mais freqüentemente encontrada em milho (SWEENEY; DOBSON, 1999; SILVA *et al.*, 2004). Terau e Ueno (1978) demonstraram que a magnitude da toxidez da AFG<sub>2</sub>, AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>1</sub>, correspondem a 10, 20 e 50% da AFB<sub>1</sub>, respectivamente.

AFM<sub>1</sub> e AFM<sub>2</sub> são derivados hidroxilados de AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>, respectivamente (SWEENEY; DOBSON, 1999). Cerca de 0,3 a 6,2% da AFB<sub>1</sub> presente na ração animal é convertida a AFM<sub>1</sub>, sendo os níveis máximos tolerados em leite de 0,05 a 0,5 µg/kg (CREPPY, 2002).

As aflatoxinas apresentam fluorescência quando excitadas pela radiação ultravioleta longa (aflatoxinas do grupo B emitem fluorescência azul, enquanto as do grupo G, verde), propriedade utilizada como recurso na quantificação por cromatografia em camada delgada (CCD). São cristalinas, termoestáveis, solúveis em solventes polares como clorofórmio e metanol. Podem ser facilmente destruídas em presença de soluções fortemente alcalinas (FONSECA, 2003).

As aflatoxinas em estado cristalino são extremamente estáveis na ausência de luz e temperatura acima de 100 °C (FONSECA, 2003). Uma solução

preparada em clorofórmio ou benzeno, devidamente estocada a baixa temperatura (-21 °C) e em condições de ausência de luz, é estável por anos, embora o anel lactona a torne susceptível à hidrólise alcalina, sendo que procedimentos que utilizam soluções de amônia ou hipoclorito são investigados com a finalidade de descontaminação. Por outro lado, em meio ácido, as aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> são convertidas a B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub> por catálise e compostos oxidantes reagem com estas moléculas reduzindo sua propriedade fluorescente (FONSECA, 2003).

A concentração de AFB<sub>1</sub> em milho pode ser reduzida por boas práticas agrícolas e por boas práticas de estocagem. Medidas preventivas são sempre mais eficazes quando se trata de micotoxinas, embora existam metodologias de descontaminação que utilizam processos químicos e físicos, como emprego de calor, microondas, tratamento com raios gama, raios X, luz ultravioleta e adsorção (CREPPY, 2002). A adsorção de aflatoxinas com aluminossilicato de sódio e cálcio hidratados, além de outros materiais inertes, tem sido empregados em ração animal industrializada com o objetivo de reduzir os níveis de AFM<sub>1</sub> em leite (CREPPY, 2002). Por outro lado, o processo químico mais eficiente para se degradar aflatoxinas em ração animal consiste na amoniação, que leva à decomposição de 95 a 98% da AFB<sub>1</sub>, sendo este procedimento utilizado em diversos países.

Cotty *et al.* (1994) propuseram utilizar cepas de *A. flavus* atoxigênicas para aflatoxinas com a finalidade de controlar a toxigenicidade de cepas selvagens, produtoras de aflatoxinas. Seu objetivo era impedir a contaminação por exclusão competitiva durante a infecção, inoculando previamente cepas sem capacidade toxigênica. Entre cinco cepas empregadas no experimento, apenas a cepa AF36 foi eficiente em impedir a contaminação por aflatoxinas, embora sob condições laboratoriais.

**Tabela 5** – Propriedades físicas e químicas das aflatoxinas.

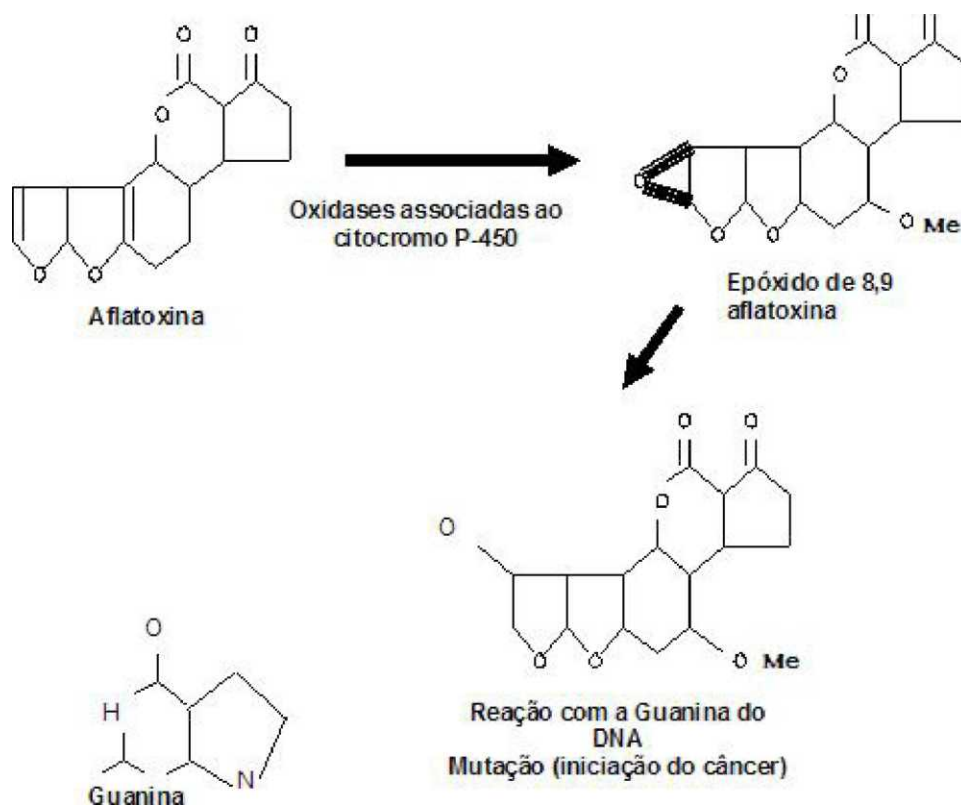
Aflatoxinas	Fórmula molecular	Massa molecular	Ponto fusão (°C)
B <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312	268 - 269
B <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314	286-289
G <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	244 - 246
G <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	33G	237 - 24G
M <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	299
M <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	33G	293
B <sub>2a</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	33G	24G
G <sub>2a</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	346	19G

**Fonte:** Fonseca, 2003.

As aflatoxinas são tóxicas, mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas, apontadas como agentes hepatocarcinogênicos (NORDIN; LUCHESE, 1998; SILVA *et al.*, 2004), sendo que a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC) declarou, em 1987, que a AFB<sub>1</sub> possui o mais alto potencial carcinogênico para o homem, com base nos estudos realizados em animais (CREPPY, 2002).

As propriedades carcinogênicas e mutagênicas das aflatoxinas B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> e M<sub>1</sub> resultam da formação de epóxidos reativos durante a metabolização hepática, na posição 8,9 do anel furano terminal e sua subsequente propriedade de ligar-se covalentemente ao ácido nucléico (NORRED, 2000; FONSECA, 2001) (Figura 6). Outra transformação hepática é a hidratação, produzindo aflatoxina B<sub>2</sub>-alfa, que interfere na síntese de proteínas (DILKIN *et al.*, 2002b).

Casos de aflatoxicose humana têm ocorrido em regiões da Ásia e África decorrentes da ingestão de cereais contaminados, principalmente o milho. A Malásia apresentou no ano de 1990, 40 casos de intoxicação por aflatoxinas, sendo que 13 crianças foram a óbito por se alimentarem de milho contaminado com altas concentrações de aflatoxina. Durante a autópsia foram detectados elevados níveis de aflatoxinas em vários órgãos, fígado, pulmão, rins, coração, cérebro e baço (FONSECA, 2003).



**Figura 6** – Mecanismo de ação tóxica do Aflatoxin-8,9 epóxido sobre o DNA.

Os principais sintomas de intoxicação por aflatoxinas em aves consistem na inibição do crescimento, inibição dos mecanismos de resistência, diminuição na produção de ovos, ovos com casca fina e sensibilidade a machucaduras no abate. Em suínos ocorrem alterações reprodutivas, redução do crescimento e alterações na conversão alimentar e em bovinos, os efeitos são alterações reprodutivas, redução do peso corpóreo e redução na produção leiteira (LÁZZARI, 1997).

**Tabela 6** – Doses agudas de aflatoxinas em animais.

Animais	DL50 (mg/Kg de peso corporal)
Marrecos	0,50
Coelhos	0,30-0,60
Frangos	6,50-16,00
Porcos	0,62
Cobaias	1,40-2,00
Ratos	0,56
Cães	1,00
Macacos	7,80

Fonte: Fonseca, 2005.

Os efeitos dependem principalmente da dose ingerida ou absorvida, podendo ser agudos quando doses elevadas alcançam o fígado e são metabolizadas a substâncias mais ativas, causando sintomatologia rápida, com alterações irreversíveis que levam o animal à morte. O efeito subagudo-crônico é caracterizado por doses de aflatoxinas não tão elevadas como em casos agudos, causando comprometimento funcional de órgãos-alvo, como fígado (degeneração gordurosa, proliferação de canais biliares, necrose e cirrose), rins (hemorragias, necrose), cérebro (Síndrome de Reye - encefalopatia com degeneração gordurosa do cérebro) e pele (lesões por contato direto) (FONSECA, 2003) (Tabela 7)

**Tabela 7** – Efeitos específicos causados por aflatoxinas em diferentes espécies animais.

Animais	Efeitos e Sintomas
Perus e marrecos	Hepatomas, fígado aumentado com zonas de necrose periportal, Hemorragia e persistência de gordura no fígado, Anorexia, fraqueza das pernas e asas, Morte
Frangos e poedeiras	Redução do crescimento e desenvolvimento de embriões, Redução na produção de ovos, gema pálida, ovos menores, Hemorragia, anorexia, fraqueza das pernas e asas, Redução do ganho de peso, Fígados e rins descoloridos, acúmulo de gordura e fibrose
Suínos	Necrose centrilobular, fibrose, proliferação de ductos biliares, Problemas renais, hemorragias, ataxia, perda de peso, Morte
Bovinos	Necrose centrilobular, fibrose, ataxia, síndrome nervosa, Infecção no miocárdio, infertilidade, redução de consumo de ração, Diminuição da gordura do leite
Eqüinos	Dano ao fígado, anorexia, hemorragia, convulsão, Morte
Coelhos	Dano ao fígado e rins, hemorragia, Morte
Peixes	Dano ao fígado e rins, Pouco desenvolvimento, Morte
Seres humanos	Imunossupressão, Síndrome de Reye, susceptibilidade a hepatite B, Câncer primário no fígado, hemorragias, Morte



Em relação à presença de micotoxinas em alimentos e rações, a legislação brasileira estabelece níveis máximos tolerados apenas para aflatoxinas. O Ministério da Saúde estabelece o limite de 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para  $\text{AFB}_1 + \text{AFG}_1$  em alimentos de consumo humano (ANVISA, 2001), e o Ministério da Agricultura e Abastecimento estabelece 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de aflatoxinas totais para matéria-prima de alimentos e rações (BRASIL, 1996), sendo esta última, comparável ao estabelecido e recomendado pela Organização Mundial da Saúde e pela Organização para Alimentação e Agricultura (FAO, 1995).

A primeira legislação a respeito de micotoxinas é de 1976, Resolução 34/76 da antiga Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) do Ministério da Saúde, cujo limite era de 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para a somatória de  $\text{AFB}_1 + \text{AFG}_1$  em todos os alimentos. O Ministério da Saúde (BRASIL, 1976) estabeleceu como máximo permitido 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de aflatoxinas totais em amendoim e derivados e milho em grão. Os países do Mercosul estabelecem os limites máximos para leite fluído ( $\text{AFM}_1 = 0,5 \mu\text{g}/\text{L}$ ), leite em pó ( $\text{AFM}_1 = 5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), amendoim e seus produtos (aflatoxinas totais = 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e milho e seus produtos (aflatoxina total = 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Na União Européia, os limites estabelecidos são de 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para aflatoxina total em grãos e de 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para  $\text{AFB}_1$ .

A biossíntese de aflatoxinas ocorre a partir de moléculas de acetato e malonil-CoA convertidas a hexanoil, unidade iniciadora, por ação de uma ácido graxo-sintase (figura 7). O hexanoil interage com uma policetida-sintase para formar o ácido norsolorínico, o primeiro precursor estável da via biossintética. Outras policetidas catalisam cerca de 12 a 17 conversões enzimáticas, formando uma série de intermediários da via, os quais são apresentados na figura 9. A partir da formação de versicolorina B, a via se ramifica para formar  $\text{AFB}_1$  ou  $\text{AFG}_1$ , os quais contém anéis dihidrobisfurano e são produzidos a partir da dimetilesterigmatocistina. A outra ramificação forma  $\text{AFB}_2$  e  $\text{AFG}_2$ , as quais contém anéis tetrabisfurano e são produzidas a partir da dihidrodimetilesterigmatocistina (SWEENEY; DOBSON, 1999).



## 2.4 FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS

Na última década, a qualidade fitossanitária do milho tornou-se relevante devido à expansão da cadeia produtiva de animais de corte (suinocultura e avicultura), além do crescimento geral das exportações de grãos como fator fundamental no equilíbrio da balança comercial por ser o Brasil dependente do setor primário da economia (PARANÁ, 2003).

A manutenção da qualidade é importante para a determinação do preço final do produto, garantia de um produto isento de riscos à saúde humana e animal, possibilidade de fácil comercialização, sem impedimento de barreiras fitossanitárias ou extra-tarifárias, além da garantia de abastecimento durante todo o ano, embora o milho seja produzido apenas num curto intervalo de tempo (FANCELLI, 1983).

A perecibilidade dos grãos de milho após a colheita é consequência não apenas da continuidade dos processos biológicos naturais como também de práticas agrícolas inadequadas que favorecem a deterioração por fungos e contaminação por micotoxinas. Segundo uma estimativa da FAO (1995) anualmente cerca de 25% do suprimento alimentar mundial é contaminado por micotoxinas. Os prejuízos causados durante a etapa pós-colheita é da ordem de 5% em relação aos grãos "*in natura*", podendo este índice elevar-se a 30% quando são consideradas regiões subdesenvolvidas de clima tropical como o Brasil (WENTZEL, 1987). Outro agravante é a dimensão continental do país que favorece um índice de perdas maiores devido à dispersão da produção, pela distância dos mercados processadores e portos exportadores (CARVALHO *et al.*, 1990).

A má qualidade fitossanitária do milho está diretamente relacionada a práticas agrícolas inadequadas, que envolvem colheita atrasada, utilização de semente de má qualidade, permanência de restos de cultura no solo, falta de controle de insetos e ácaros (LÁZZARI, 1997), embora as condições climáticas adversas nas fases finais de maturação e durante a colheita sejam as maiores responsáveis por infecções fúngicas (SAUER, 1988). Entre as práticas culturais relacionadas ao campo, que diretamente afetam a infecção fúngica, destaca-se a seleção do terreno, tipo de híbrido, programas de adubação, densidade populacional, data de plantio, irrigação, rotação de cultura e manejo de cultura

(FONSECA, 2001).

A colheita realizada tardiamente proporciona condições favoráveis ao ataque de insetos e roedores, com conseqüente desenvolvimento de fungos e micotoxinas (PACHECO *et al.*, 1997; SANTINI *et al.*, 2004). O período da maturidade fisiológica é identificado pelo aparecimento de uma camada negra no ponto de inserção do grão no sabugo, que interrompe sua conexão nutricional com a planta, fase em que o grão não mais acumula matéria seca e o teor de umidade é de 30 a 38% (EICHELBERGER, 2000). Alguns produtores prolongam o tempo de permanência do milho no campo com o intuito de que o cereal atinja menores valores de umidade, simplesmente por falta de secadores artificiais (GERAGE *et al.*, 2004). Dados de campo mostram que com 30 dias de permanência após a maturação dos grãos, o teor de umidade é reduzido de 35% a 18% e com 60 dias para apenas 17%, não havendo justificativas para a permanência de milho por períodos superiores a 20 ou 30 dias após a maturação fisiológica dos grãos (LÁZZARI, 2001). O conhecimento da curva de secagem no campo para cada variedade ou híbrido favorece o sucesso da colheita, pois esta é a operação mais importante do ciclo produtivo, depois da implantação bem sucedida da lavoura, recomendando-se colher o milho com teor de umidade entre 18 e 26% (MANTOVANI, 1989).

A incidência de *Aspergillus* spp. elevou-se com o retardamento da colheita, explicado pela redução do teor de umidade dos grãos, pois este gênero fúngico coloniza substratos com baixo teor de umidade (SANTINI *et al.*, 2004). Com relação a *F. verticillioides*, foi detectado uma redução de incidência à medida que se retardava a colheita, indicando que a atividade metabólica desse fungo é mais acentuada no início do período de maturação fisiológica do grão, quando apresenta o máximo de nutrientes e elevado teor de umidade.

A infestação de insetos é um dos principais fatores que afetam a qualidade do milho no campo, pois danifica a proteção tegumentar do grão, facilitando a penetração do fungo (BAKAN *et al.*, 2002). O inseto também opera como vetor do fungo micotoxigênico, sendo assim, o milho transgênico que expressa a endotoxina Bt apresentou menores teores de fumonisinas quando comparados ao milho convencional (BAKAN *et al.*, 2002). O milho resistente a insetos, coletado na França e Espanha, durante a safra de 1999, apresentou de 4 a 18 vezes menos biomassa fúngica que o milho tradicional. As concentrações de fumonisina B<sub>1</sub>

variaram de 0,05 a 0,3  $\mu\text{g/g}$  para milho B<sub>t</sub> e de 0,4 a 9  $\mu\text{g/g}$  para milho tradicional, demonstrando que a infestação por insetos influencia a presença de *Fusarium* spp. e fumonisinas em milho.

De acordo com Tanaka (2001) a alta incidência de *Fusarium verticillioides* no campo está diretamente relacionada com a capacidade do fungo ser transportado pela semente, em concordância com os dados de Casa *et al.* (1998), que observaram a ocorrência de podridões em sementes e morte de plântulas, semeadas em condições de estresse pela alta umidade e baixas temperaturas. Os mesmos autores relataram a possibilidade da transmissão sistêmica de *F. verticillioides* pelas sementes, tendo como principal consequência a podridão de espiga e baixo rendimento produtivo.

O primeiro a relatar que *F. verticillioides* poderia infectar milho de forma latente e não sintomática foi Foley (1962), fato comprovado por Whindam e King (1983), comprovando por experimentos que a infecção latente, portanto sem comprometimento da germinação ou emergência, necessita de condições de estresse para que o fungo se torne patogênico; por outro lado, em plantas adultas, o fator desencadeante dos sintomas seria o processo de senescência dos tecidos vegetais.

Denti e Reis (2001) estudaram o efeito do tipo de cultivo e densidade de plantas sobre a incidência de podridões da base de colmo (PBC) e rendimento de grãos de milho ocasionados por *F. verticillioides*. Resultados obtidos em concordância com Del Rio e Zúgia (1991) mostram que o cultivo de milho sob monocultura favorece o aumento da PBC, quando comparado com rotação de cultura, à medida que a incidência da doença apresentou uma relação direta com a quantidade de restos culturais infectados presentes na superfície do solo. Denti e Reis (2001) observaram em concordância com Agrios (1997) e Machado (1994) que a PBC foi favorecida também pela densidade das plantas, pois esta conduziria a um desequilíbrio nutritivo por competição entre as plantas. Agrios (1988) e Blum *et al.* (1998) observaram que o adensamento de plantas provoca o aumento de podridão de espigas, aumentando a incidência de grãos ardidos, causado por *F. verticillioides*. Esses resultados mostram que o manejo adequado com práticas simples, como rotação de culturas e espaçamento adequado entre plantas reduz a incidência de *F. verticillioides* no campo e conseqüentemente as podridões da base do colmo e espigas.

Múltiplos fatores estão envolvidos na infecção de milho por *A. flavus*, como nível de inóculo, seca, temperatura, práticas culturais, condições climáticas, sendo que o nível de conídios no campo destaca-se como o principal (WICKLOW *et al.* 1988). O excesso de irrigação e precipitação pluviométrica reduz o nível de inóculo, diminuindo a incidência de *Aspergillus* na planta, enquanto que em épocas de seca a contaminação torna-se maior, embora Jones *et al.* (1981) tenham relatado que plantas expostas ao estresse pela seca, apresentem mais grãos infectados que os provenientes de áreas irrigadas.

O transporte rápido de cargas recém-colhidas é fundamental para a manutenção da qualidade fitossanitária do milho, pois longos períodos de permanência de grãos em caminhões, sujeitos a todas as formas de intempéries climáticas afetam a contaminação fúngica ou mesmo a produção de micotoxinas nessa massa de grãos (LÁZZARI, 1997).

Outro ponto logístico para a preservação da qualidade do milho é a armazenagem pré-secagem, que acontece imediatamente após a descarga do milho transportado até a cooperativa. A carga é separada de acordo com sua umidade e pré-armazenada em grandes depósitos conhecidos como moegas, antes do processo de secagem. Por ser uma etapa também crítica para a manutenção de qualidade do cereal, é importante avaliá-la em termos de contaminação fúngica e presença de micotoxinas (LÁZZARI, 2001).

Durante a pré-armazenagem na moega é fundamental o tempo de permanência do milho, estando este mais sujeito à contaminação com o decorrer do tempo, ou seja, quanto maior o tempo de permanência do mesmo na moega, maior a probabilidade de contaminação. Fatores abióticos como temperatura, umidade e teor de água disponível são também importantes (MILLER, 1995).

Na armazenagem, a possibilidade de contaminação também existe e é, em muitas situações, dependendo da flora toxigênica predominante, responsável pela presença das toxinas. Dentro do silo, em função das correntes de convecção, a umidade é deslocada e se concentra nas massas de grãos mais frias do silo. Este aumento localizado de umidade desencadeia o crescimento de fungos formando-se assim "bolsões de toxinas", que no inverno tendem a se localizar no topo do silo e no verão, em sua base (LÁZZARI, 1997).

A distribuição heterogênea das impurezas, poeiras e grãos quebrados no interior do silo também constituem fatores que desencadeiam o

crescimento fúngico. O grão mofado, também denominado de "ardido", além da possibilidade de estar contaminado por micotoxinas, apresenta uma perda no teor de massa seca, gordura, vitaminas, minerais e aminoácidos (MALLMANN, 1998).

Dentre todos os fatores que afetam o crescimento fúngico e produção de micotoxinas, a água é o mais importante (MARIN *et al.*, 1999), pois segundo Miller *et al.*, (1995), o desenvolvimento processa-se apenas em um sistema aquoso, sendo que Christensen e Sauer (1982) dividiram os fungos que infectam grãos e sementes em dois grupos: fungos de campo e fungos de armazenamento, utilizando como critério seus requisitos ecológicos em termos de exigência de água disponível. Segundo esta classificação, fungos de campo requerem teor de umidade do substrato acima de 20%, enquanto de armazenamento teor de umidade do grão acima de 16%, embora Hill *et al.* (1985) considere a classificação inapropriada para áreas geográficas de clima tropical-úmido, pois fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, considerados fungos de armazenamento, podem ocorrer antes da colheita, como constatado por Payne (1992) e o gênero *Fusarium*, por sua vez considerado um fungo de campo (MILLER, 1995), é freqüentemente encontrado no armazenamento. Esse fato corroborou para ampliação da classificação em três grupos distintos, incluindo entre os pré-existentes, o grupo dos fungos intermediários, sendo fungos presentes tanto em etapas pré como pós-colheita (LÁZZARI; LÁZZARI, 2001).

Pinto (2005), em concordância com autores supracitados, conclui que a umidade e temperatura são dois parâmetros fundamentais no processo de biossíntese de micotoxinas, embora o índice de precipitação nos meses de floração e maturação dos frutos interfira na contaminação, principalmente por fungos do gênero *Fusarium spp.*, sendo que acentuadas oscilações de temperatura, tais como dias quentes seguidos por noites frias podem favorecer a presença de *Fusarium spp.* em amostras de campo (NORDIN; LUCHESE, 1998). A combinação de precipitação pluviométrica e elevada umidade relativa nessas fases exerce grande influência no aparecimento de contaminação com toxinas de *Fusarium* em grãos recém-colhidos (ABBAS *et al.*, 1995; NORDIN; LUCHESE, 1998).

Marin *et al.* (1999) estudaram o efeito da atividade de água ( $A_w$  0,92-0,98) e temperatura (15-30°C) sobre o crescimento e produção de fumonisinas em amostras de milho por *F. verticillioides* e observaram que o crescimento fúngico máximo ocorria em atividade de água de 0,98, sendo que a 0,92 os resultados eram

muito inferiores. A produção de fumonisinas apresentou-se ótima sob condições de crescimento fúngico a 25 °C e atividade de água de 0,98. A temperatura é fundamental para o crescimento fúngico, pois influencia na atividade enzimática responsável pela formação da toxina (FONSECA, 2005).

Almeida *et al.* (2002) avaliaram a micoflora e contaminação por fumonisinas em solo e amostras colhidas em diferentes estágios fenológicos da planta de duas regiões do Estado de São Paulo. Os dados obtidos mostraram prevalência de *F. verticillioides* em 35% das amostras de Capão Bonito e 49% das amostras de Ribeirão Preto. A análise da microbiota do solo demonstrou *Penicillium* como o gênero predominante, embora *F. verticillioides* esteve presente em 55,5% das amostras de Capão Bonito e 26,7% das amostras de Ribeirão Preto. Com relação à atividade de água, o milho contaminado com *F. verticillioides* apresentava níveis de 0,7 a 0,8. Análises quantitativas de fumonisinas revelaram que 88,5% das amostras de Capão Bonito apresentavam FB<sub>1</sub> (0,09 a 10,87 µg/g) e 53,8% FB<sub>2</sub> (0,05 a 0,52 µg/g). As amostras de Ribeirão Preto apresentaram níveis de contaminação mais elevados, sendo que 93,5% das amostras estavam contaminadas por FB<sub>1</sub> (0,11 a 17,69 µg/g), enquanto 61,3% por FB<sub>2</sub> (0,05 a 5,24 µg/g). Valores de atividade de água foram maiores em Ribeirão Preto, 0,98 a 0,99 contra 0,93 a 0,94 de Capão Bonito, mostrando ser fator importante na determinação do nível de contaminação de micotoxinas. Outro fator preponderante foi a temperatura média do período, cerca de 24,8 °C para Ribeirão Preto e 23,5 °C para Capão Bonito, sendo a temperatura ideal para produção de fumonisinas de 25 °C (NELSON *et al.*, 1983). Este trabalho mostrou forte correlação entre fatores abióticos (temperatura e atividade de água) com produção de fumonisinas (ALMEIDA *et al.*, 2002).

## 2.5 OCORRÊNCIA NATURAL DE FUMONISINAS E AFLATOXINAS

O primeiro trabalho científico que relatou a ocorrência natural de fumonisinas em milho brasileiro foi realizado em amostras de rações associadas com surtos de micotoxicoses em várias espécies animais, coletadas do Estado do Paraná, tendo sido detectado um nível médio de 8,9 µg/kg para FB<sub>1</sub> e 2,8 µg/kg para FB<sub>2</sub> (SYDENHAM *et al.*, 1992).



Hirooka *et al.* (1996) analisaram 48 amostras de milho provenientes de três Estados brasileiros (39 amostras do Estado do Paraná e 9 do Mato Grosso do Sul e Goiás), quanto à contaminação por fumonisinas. FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> foram detectadas em 97,4% e 94,8% das amostras, respectivamente. Em todas as amostras provenientes dos Estados de Mato Grosso do Sul e Goiás foram detectadas FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> em níveis de 4,90 a 18,52 µg/g e 3,62 a 19,13 µg/g, respectivamente. As 39 amostras do Estado do Paraná apresentaram níveis de FB<sub>1</sub> variando de 0,60 a 12,55 µg/g e FB<sub>2</sub> de 1,20 a 10,24 µg/g.

Nordin e Luchese (1998) analisaram 115 amostras de milho da região do Vale do Taquari (RS) e detectaram apenas uma amostra positiva para AFB<sub>1</sub>, com concentração de 10 µg/kg.

A análise de 150 amostras de milho recém-colhido provenientes de três regiões do Estado do Paraná, demonstrou níveis de 0,07 a 14,36 µg/g de FB<sub>1</sub> e de 0,08 a 6,92 µg/g para FB<sub>2</sub>, e positividade para *F. verticillioides* em praticamente todas as amostras coletadas (ONO *et al.*, 1999).

A análise microbiológica de 195 amostras de três híbridos de milho demonstrou a prevalência do gênero *Fusarium* (média de 57% de frequência), seguido por *Penicillium* (média de 40%) e *Aspergillus* (média de 17%) (ORSI *et al.*, 2000). De um total de 195 amostras, 176 amostras (90,2%) estavam contaminadas com FB<sub>1</sub> e 190 amostras (97,4%) com FB<sub>2</sub>, sendo que os valores para FB<sub>1</sub> variaram de 0,87 a 49,31 µg/g e para FB<sub>2</sub> de 1,96 a 29,16 µg/g. Os níveis predominantes para FB<sub>1</sub> foram de 3,1 a 5,0 µg/g (46 amostras, 23,3%) e 5,1 a 8,0 µg/g (38 amostras, 19,5%), enquanto que para FB<sub>2</sub>, de 5,1 a 8,0 µg/g (121 amostras, 62%) (ORSI *et al.*, 2000).

Dilkin *et al.* (2000) ao avaliarem a microbiota de 15 amostras de milho (cinco variedades) recém-colhido, relataram contaminação fúngica por *Aspergillus* spp. (23,6%), *Penicillium* spp. (14,3%) e *Fusarium* spp. (57,1%), não havendo diferença significativa entre os híbridos com relação à microbiota. Os híbridos recém-colhidos não apresentaram níveis detectáveis de aflatoxinas, embora 26,7% dos grãos estivessem danificados por insetos e 11,3% danificados pelo desenvolvimento de fungos.

A análise de 407 amostras de milho da Região Sul do Brasil e rações coletadas de diferentes granjas e indústrias agropecuárias demonstrou positividade em 32% das amostras para FB<sub>1</sub>, com níveis variando de 0,086 a 78,92

µg/g (MALLMANN *et al.*, 2001).

Van der Westhuizen *et al.* (2003) analisaram 76 amostras de milho da safra 1999/2000 de Santa Catarina (39 amostras da Região Oeste, 17 do Norte e 20 do Sul). Espécies de *Fusarium* foram encontradas em 93% das amostras, sendo *F. verticillioides* o fungo prevalente em amostras das três regiões, com incidência média (porcentagem de grãos infectados) de 14, 11 e 18% para as regiões oeste, norte e sul, respectivamente. Todas as amostras apresentaram contaminação por fumonisinas, sendo que o valor médio de fumonisina total (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub> + FB<sub>3</sub>) para as regiões oeste, norte e sul foram de 3,2, 3,4 e 1,7 µg/g, respectivamente.

Em 40 amostras de milho provenientes da Região Sul do Brasil os principais gêneros encontrados foram *Penicillium* (16 amostras), *Aspergillus* (14 amostras) e *Fusarium* (10 amostras), com contagem total de fungos variando de  $3,33 \times 10^3$  a  $2,23 \times 10^5$  UFC/g. As aflatoxinas foram detectadas em 62,5% (25) das amostras, com concentrações variando de 1 a 540 µg/kg (MORAES *et al.*, 2003).

Bittencourt *et al.* (2005) analisando 60 amostras de milho obtidos em São Paulo detectaram níveis de FB<sub>1</sub> variando de 1,1 a 15,3 µg/g e de FB<sub>2</sub> de 0,2 a 3,9 µg/g, sendo a positividade para FB<sub>1</sub> de 83% (n=50) e para FB<sub>2</sub> de 72% (n=43) das amostras analisadas.

Na análise de 130 amostras de milho de Honduras, Julian *et al.* (1995) observaram predominância de *F. verticillioides* (75% das amostras) e níveis de fumonisinas variando de 0,07 a 6,55 µg/g.

Chamberlain *et al.* (1993) analisaram 28 amostras de milho provenientes do Estado da Geórgia, nos Estados Unidos quanto à presença de aflatoxinas e FB<sub>1</sub>, sendo que 27 amostras foram positivas para aflatoxinas totais, com concentração média de 73 µg/kg 24 amostras positivas para FB<sub>1</sub>, com concentração média de 0,87 µg/g.

A análise de 197 amostras de milho provenientes do Quênia, demonstrou que 5,07% (n=10) das amostras estavam contaminadas com FB<sub>1</sub> acima de 1 µg/g (KEDERA *et al.*, 1999). As 4 amostras mais contaminadas apresentaram níveis de FB<sub>1</sub> na faixa de 3,6 a 11,6 µg/g e constituíram o milho de baixa qualidade.

Um total de 100 amostras de milho e 50 amostras de rações destinadas à alimentação de equinos foram coletadas no ano de 1998 em algumas regiões da Índia e analisadas quanto à contaminação por FB<sub>1</sub>. Noventa e uma amostras de milho (91%) e 42 amostras de ração (84%) foram positivas para FB<sub>1</sub>,

sendo que a contaminação em milho variou de 0,1 a 87,0  $\mu\text{g/g}$ , enquanto que na ração de 0,02 a 28,0  $\mu\text{g/g}$ , indicando alta incidência de  $\text{FB}_1$  em milho e amostras de rações na safra de 1998 na Índia (JINDAL *et al.*, 1999).

Na análise de 171 amostras de milho da Espanha, as  $\text{FB}_1$  e  $\text{FB}_2$  foram detectadas em 79,5% (n=136) e 14,6% (n=25) das amostras, respectivamente, com média de 3,3  $\mu\text{g/g}$  para  $\text{FB}_1$  e de 1,7  $\mu\text{g/g}$  para  $\text{FB}_2$  (CASTELLÁ *et al.*, 1999).

A análise de 74 amostras de milho coletadas no Nepal demonstrou a predominância de *F. verticillioides*, sendo as fumonisinas detectadas em concentração maior que 1  $\mu\text{g/g}$  em 17 amostras (22%) (DESJARDINS *et al.*, 2000).

A avaliação de 50 amostras de milho da região de Benim (Oeste da África) de 1999 a 2003 demonstrou a predominância de *Fusarium* spp. (46%) e *Aspergillus* spp. (35%). As duas espécies de *Fusarium* mais comumente isoladas foram *F. verticillioides* (68%) e *F. proliferatum* (31%). As 50 amostras (100%) foram positivas para fumonisinas, com níveis variando de não detectado a 12  $\mu\text{g/g}$  em 1999-2000, não detectado a 6,7  $\mu\text{g/g}$  em 2000-2001 e não detectado a 6,1  $\mu\text{g/g}$  na safra de 2002 a 2003 (FANDOHAN *et al.*, 2004).

Considerando que a ocorrência de fungos e micotoxinas é inevitável, o monitoramento constante é essencial para a manutenção da qualidade fitossanitária do milho a fim de reduzir os prejuízos econômicos, assim como os riscos à saúde humana e animal.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de fungos e micotoxinas na tecnologia de pós-colheita do milho.

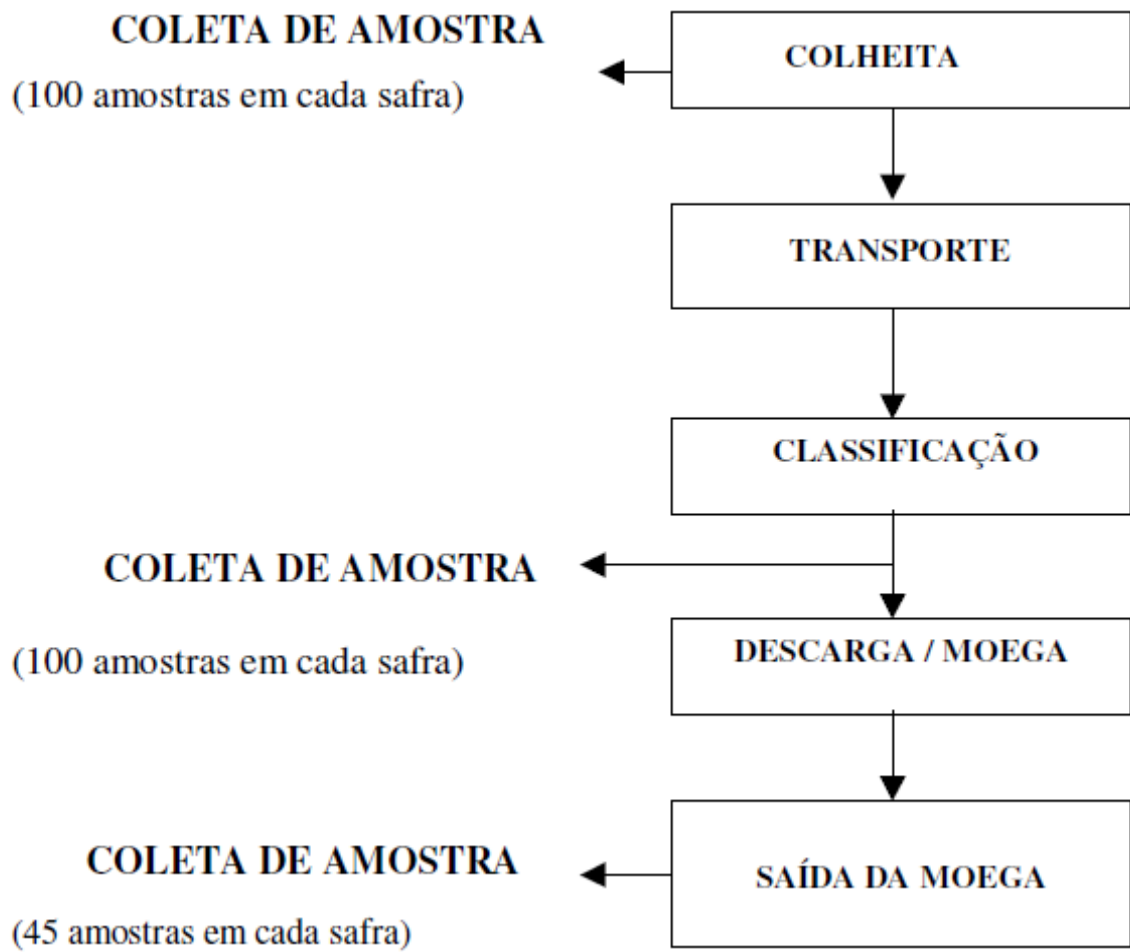
#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito do intervalo de tempo entre a colheita e a pré-secagem sobre a contaminação fúngica e teores de fumonisinas em amostras de milho recém-colhido, provenientes da Região Norte do Estado do Paraná;

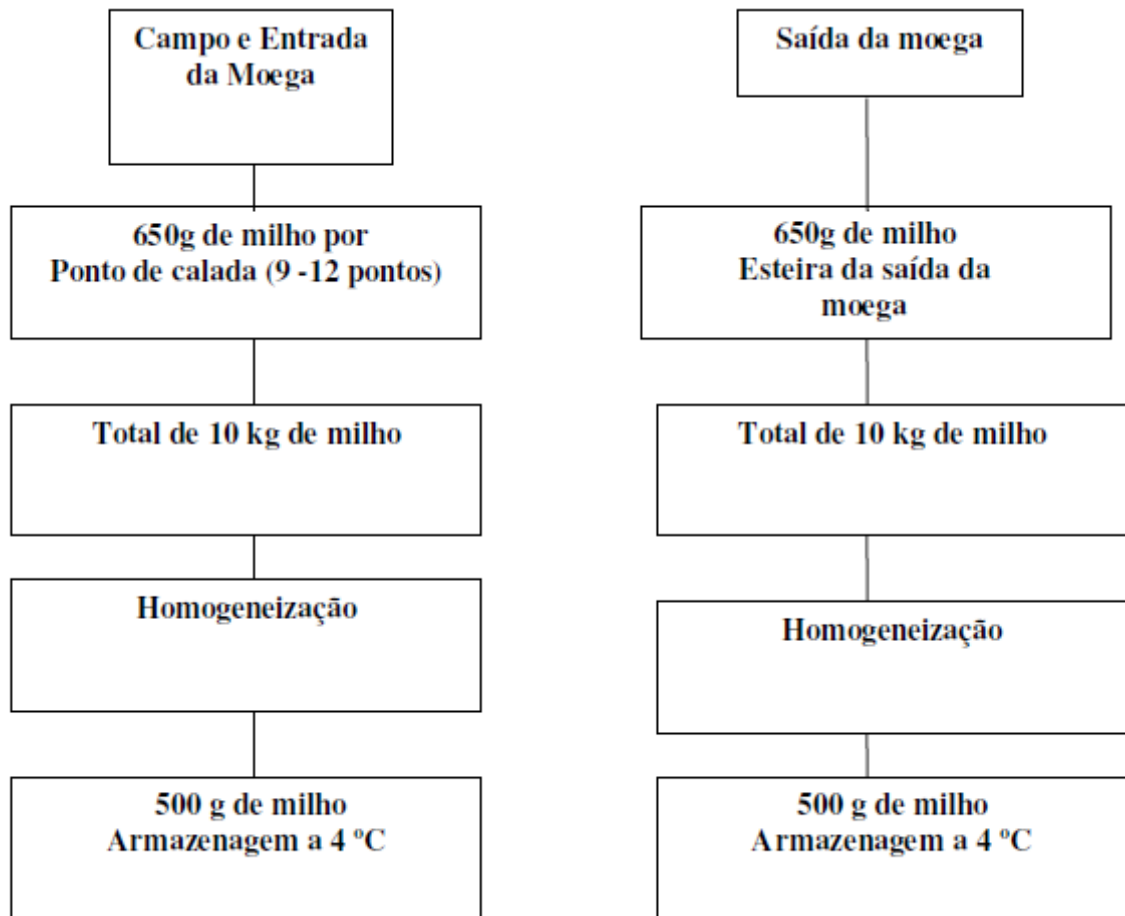
Avaliar a qualidade micotoxicológica de amostras de milho utilizado como matéria-prima por indústrias processadoras da Região Norte do Estado do Paraná;

Comparar a eficiência das metodologias Cromatografia em Camada Delgada (CCD), espectrofluorimetria e determinação de pontos de fluorescência na análise de aflatoxinas em amostras de milho contaminadas.

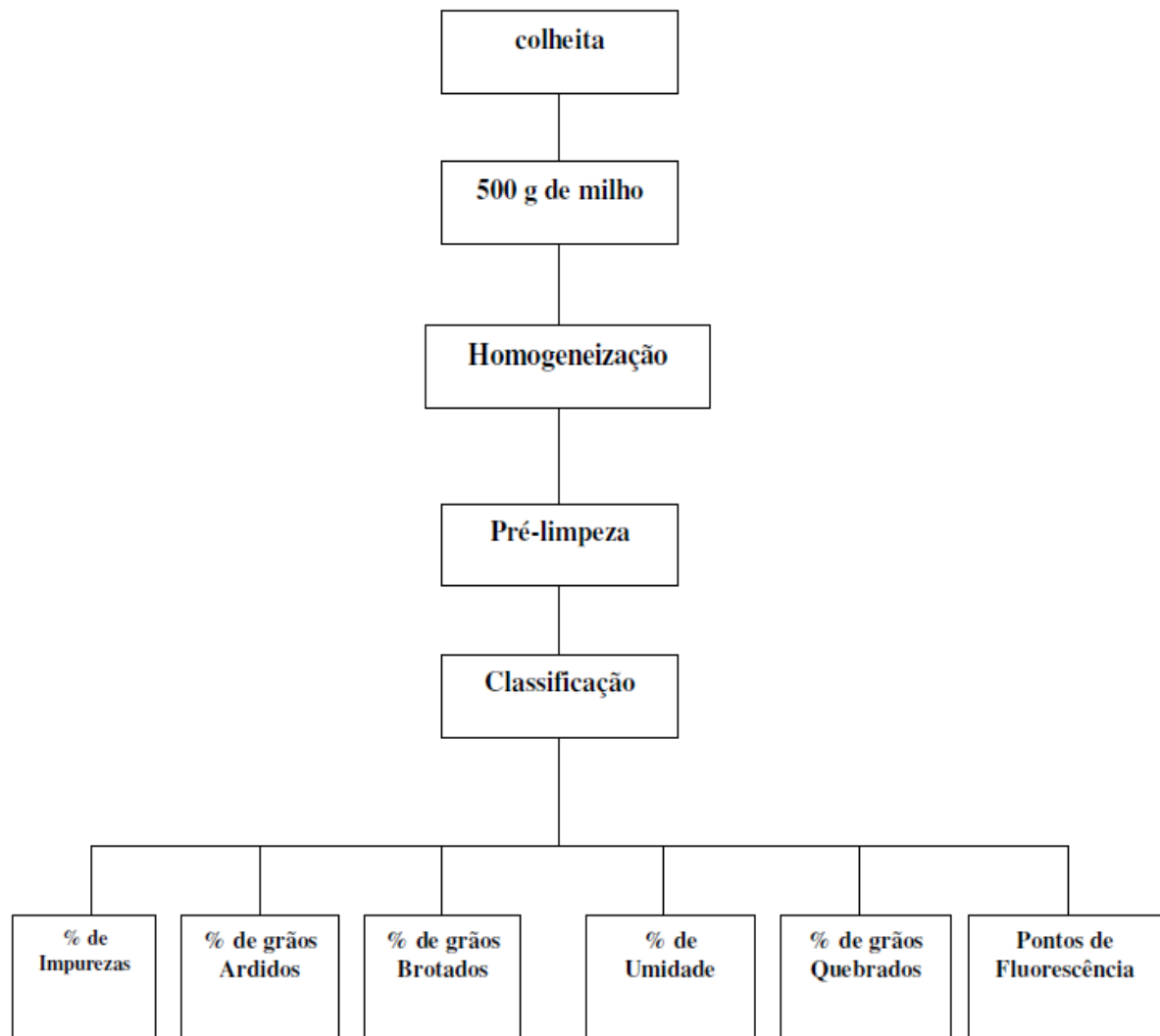
#### 4 METODOLOGIA



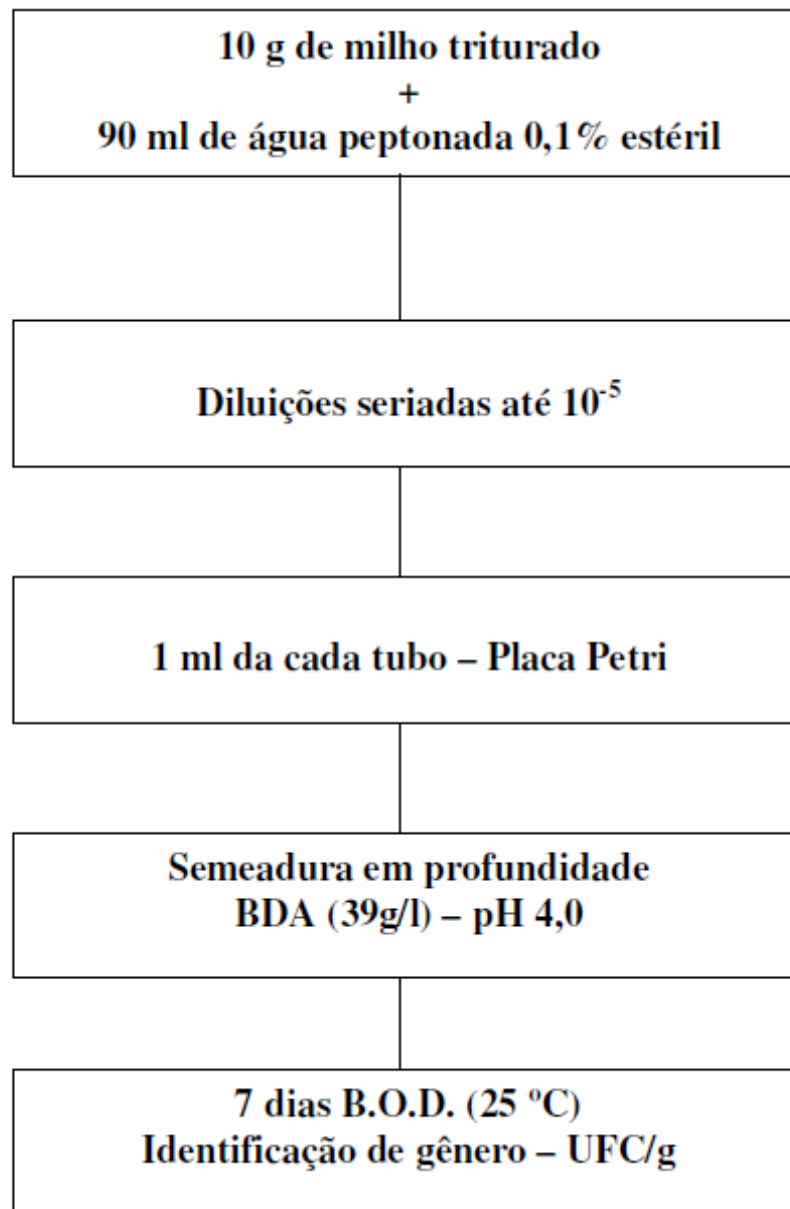
**Figura 8** – Fluxograma dos pontos de coleta das amostras.



**Figura 9** – Fluxograma da amostragem segundo os pontos de coleta.

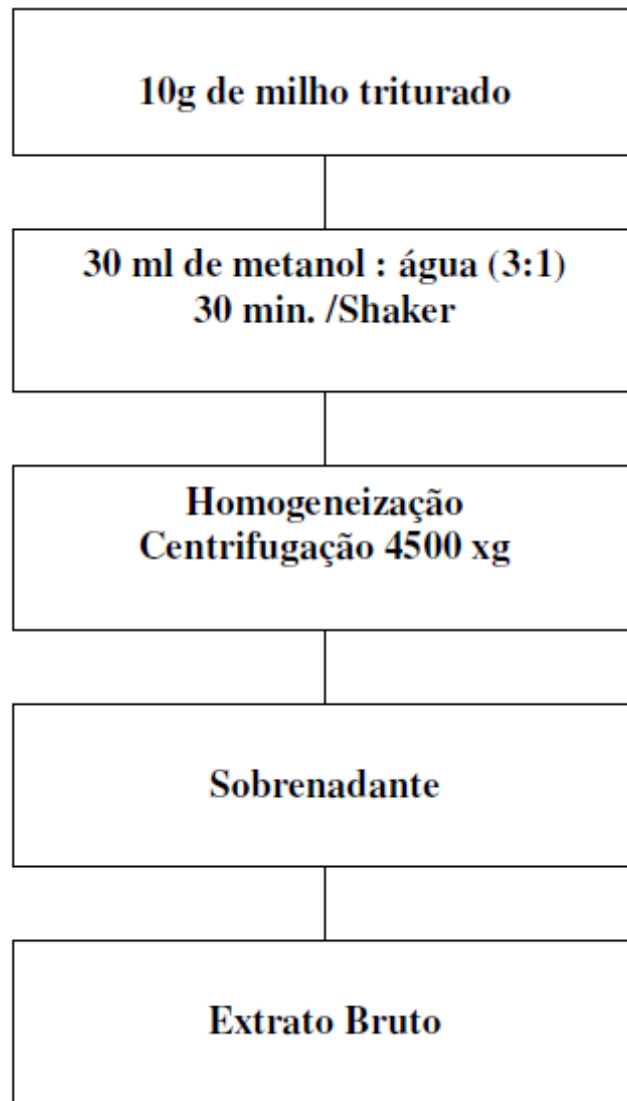


**Figura 10** – Fluxograma da classificação de milho adotada pelas cooperativas.

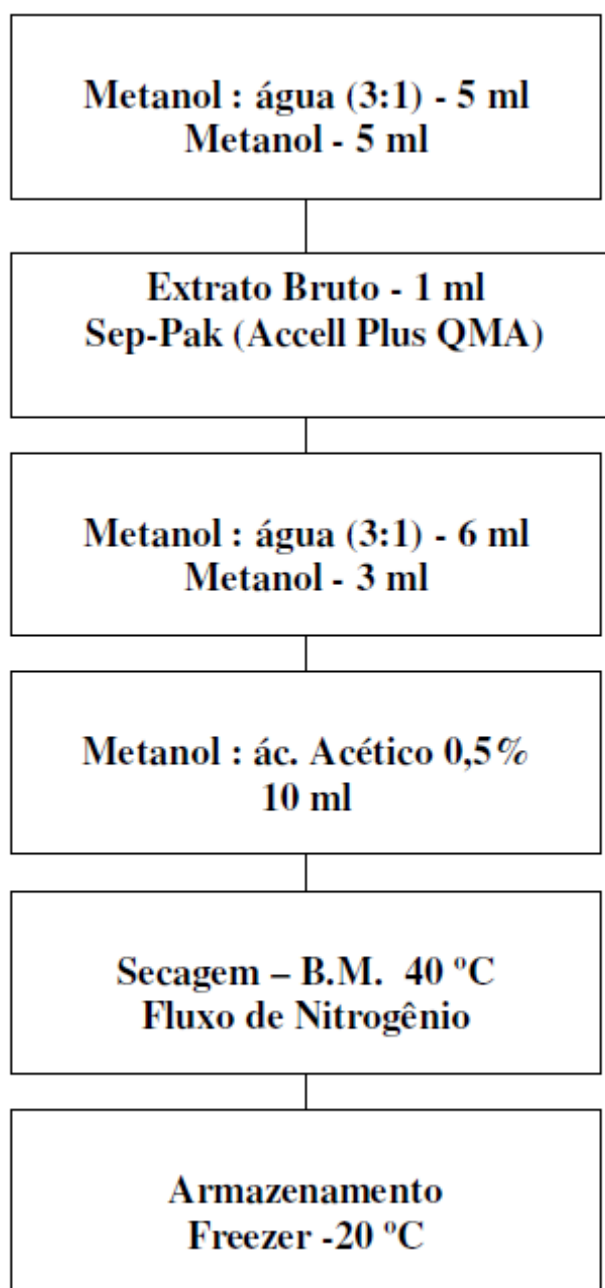


**Figura 11** – Fluxograma para contagem de bolores e leveduras em amostras de milho.

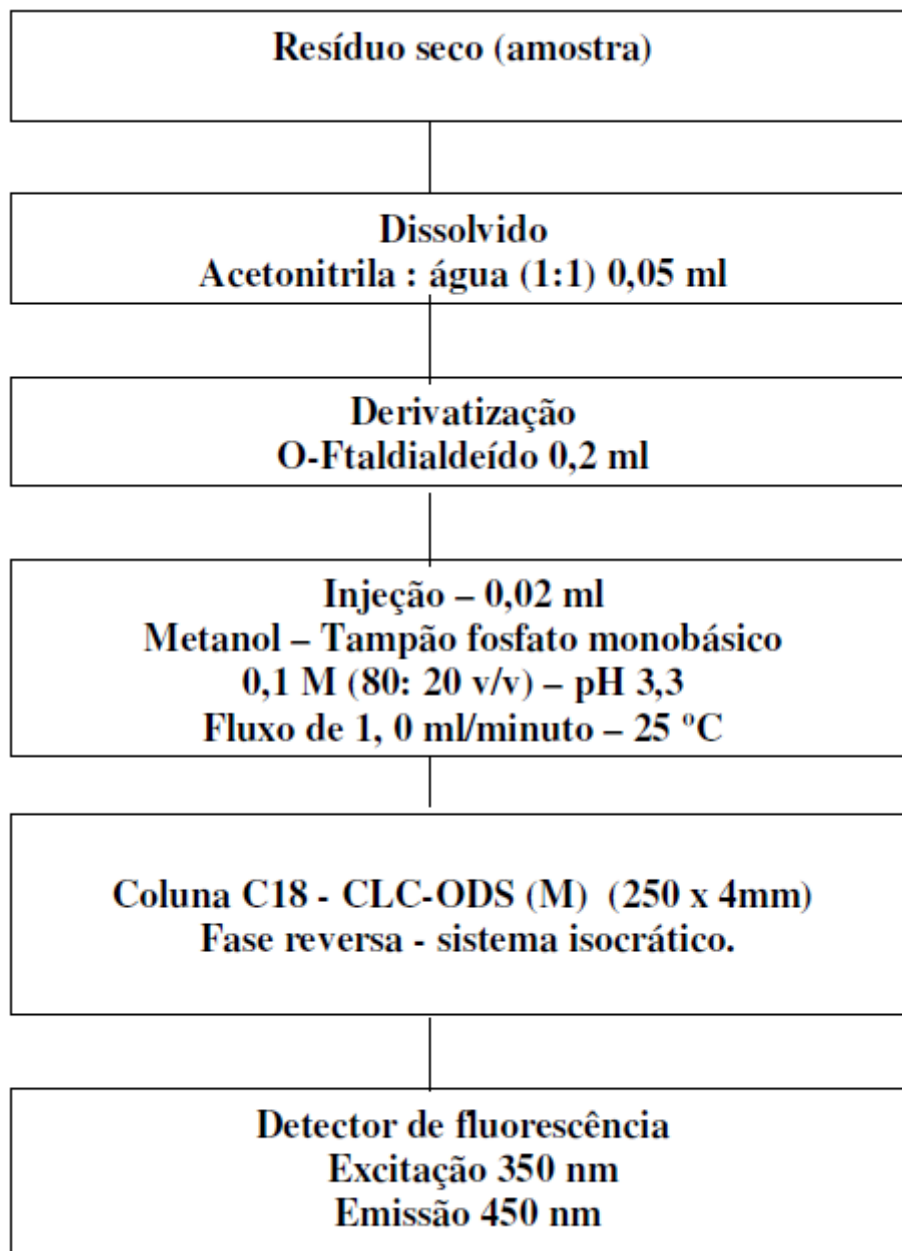




**Figura 12** – Fluxograma de extração de fumonisinas, segundo Shephard *et al.* (1990) modificado por Ueno *et al.* (1993).



**Figura 13** – Fluxograma da etapa de pré-limpeza do extrato bruto por coluna de troca iônica forte.



**Figura 14** – Fluxograma de quantificação de fumonisinas por CLAE segundo Shephard *et al.* (1990) modificado por Ueno *et al.* (1993).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

- Effect of time interval from harvesting to pre-drying step on natural fumonisin contamination in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil.
- Mycotoxicological quality evaluation of corn samples used as raw material by processing industries in the North Region of Paraná State, Brazil.
- Comparação de metodologias: cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofluorimetria e análise por contagem de pontos de fluorescência para detecção de aflatoxinas em milho.

No primeiro artigo (Effect of time interval from harvesting to pre-drying step on natural fumonisin contamination in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil) foi avaliada a influência do intervalo de tempo decorrido entre a colheita e etapa de pré-secagem na contaminação por fungos e fumonisinas, em amostras de milho recém-colhido comercializado por uma cooperativa da Região Norte do Estado do Paraná. As amostras foram cedidas por cooperativa de milho. Níveis de fumonisinas e intervalo de tempo mostraram correlação positiva ( $p=0,96$ ) ( $p<0,05$ ). Esses resultados indicaram que retardar o processo de secagem pode aumentar os níveis de fumonisinas, contudo, o adequado manejo pós-colheita é essencial para assegurar a qualidade do milho.

No segundo artigo apresentou como objetivo principal avaliar a qualidade micotóxica de milho comercializado por empresas processadoras de milho. A amostragem foi realizada em dois pontos da cadeia produtiva do milho, ou seja, recepção e pré-secagem. Níveis baixos de fumonisinas foram detectados em amostras de milho recebidas por empresas processadoras da Região Norte do

Estado do Paraná. Esses resultados ratificam a importância do constante monitoramento em todas as etapas da produção do milho, minimizando riscos à saúde humana e animal e adequando sua qualidade aos padrões recomendados para comercialização.

O terceiro artigo objetivou comparar técnicas de detecção de aflatoxinas em milho naturalmente contaminado por *Aspergillus/Zus flavus*, segundo contagem de pontos de fluorescência, cromatografia em camada delgada (CCD) e espectrofluorimetria. Os resultados obtidos por CCD e espectrofluorimetria apresentaram boa correlação ( $r=0,97$ ) para análise de milho naturalmente contaminado por aflatoxinas. A técnica de contagem de pontos de fluorescência apresentou 20% de resultados falso-negativos, sugerindo seu emprego como triagem para seleção de lotes com possível contaminação para serem analisados posteriormente por técnicas mais sensíveis e precisas.

**ARTIGO A: Effect of time interval from harvesting to pre-drying step on natural fumonisin contamination in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil.**

**Abstract**

Natural mycoflora and fumonisins were analyzed in 490 samples of freshly harvested corn (2003 and 2004 crops) from the North region of Paraná State, Brazil and correlated to the time interval between the harvesting and the pre-drying step. The sampling was carried out in three points of the productive chain, i.e., as field samples (n=100), reception samples (n=100) and at the pre-drying samples step (n=45), for each crop. The two crops showed a similar profile concerning the fungal frequency. *Fusarium* sp. was the prevalent genera (100%) for the three sampling sites from both crops, followed by *Penicillium* sp. which was detected in 98%, 95% and 97% of the samples (2003 crop), respectively. Contamination frequency by *Aspergillus* sp. was lower and ranged from 10 to 18% (2003 crop) and from 6 to 8% (2004 crop). Fumonisins (FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub>) were analyzed by a reversed-phase isocratic HPLC system. They were detected in all samples from the three sets and us crops. The levels ranged from 0.11 to 15.32 mg/g (mean of 2.48 ± 2.89 mg/g) in field samples, from 0.16 to 15.90 µg/g (mean of 2.70 ± 2.65 mg/g) in reception samples and from 0.02 to 18.78 µg/g (mean of 3.61 ± 4.06 mg g) in pre-drying samples belonging to 2003 crop. Samples from 2004 crop showed lower contamination and fumonisin levels ranged from 0.07 to 4.78 mg/g (mean of 1.02 ± 0.77 mg/g) in field samples, from 0.03 to 4.09 µg/g (mean of 1.11 ± 0.99 mg/g) in reception samples and from 0.11 to 11.21 µg/g (mean of 1.57 ± 2.03 µg/g) in pre-drying samples. The mean fumonisin level increased gradually from =D5.0 mg/g to 18.78 µg/g as the time interval between the harvest and the pre-drying step increased from 3.2 to 8.9 hours (2003 crop). The same profile was observed for samples from 2004 crop. Fumonisin levels and the time interval (p=0.96) showed positive correlation (p < 0.05). These results indicate that delay in drying process can increase fumonisin levels; therefore adequate post-harvest management is necessary for assuring the corn quality.

**Keywords:** Corn producing chain. Fumonisins. Pre-drying step. Mycoflora

## Introduction

The State of Paraná is the main corn producer in Brazil accounting for 10 million tons/year that correspond to 30% of the national production (CONAB, 2007). The social and economic importance of corn is evident by its inclusion in more than 500 derived products in addition to the direct participation in the productive chain of poultry and swine as major ingredient of animal feed (ABIMILHO, 2006). Nevertheless, due to its nutritional quality it becomes an excellent substrate for mould contamination, mainly *Fusarium verticillioides*, primary corn phytopathogen and producer of fumonisins a group of mycotoxins (Bezuidenhout et al., 1988; Nelson et al., 1991; Desjardins et al., 1994). Although 28 analogues of fumonisins have been characterized so far (Ah-Seo & Won Lee, 1999), only FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> and FB<sub>3</sub> occur as natural contaminants of corn and corn-based foods (Thiel et al., 1991). The high incidence of fumonisins in corn is associated with serious risks to the human and animal health. Fumonisins cause leukoencephalomalacia in equines (Marasas et al., 1988) pulmonary edema in swine (Ross et al., 1990) hepatocarcinoma in rats (Norred & Voss, 1994) and immunosuppression in poultry (Weibking, et al., 1993). In humans, epidemiological studies indicate its association with esophageal cancer and primary liver cancer (Gelderblom et al., 1992; Ueno et al., 1997.).

The World Trade Organization reduced the tariff barriers on grain, but focused attention on natural toxins and phytosanitary contaminants. Strict guideline proposals enacted for aflatoxins, ochratoxin, fumonisin and patulin tolerances can have great impact on the trade of grains and other commodities (MILLER, 1996). Both fungal and mycotoxin contamination is regarded as the primary concern in the effort to reduce problems, which could compromise exportation of corn based food chain.

Taking into account the economic and nutritional importance of corn and the serious risks to the human and animal health due to fumonisin occurrence in this cereal, the aim of this study was to evaluate the natural fungal contamination and occurrence of fumonisins in freshly harvested corn samples of Paraná State, Brazil, and correlate to the time interval from the harvesting to pre-drying step.

## Material and Methods

### *Characterization of the studied area*

The State of Paraná comprises 199,570 km<sup>2</sup> and is located in Southern Brazil (24°30'S; 50°30'W), and bisected by the Tropic of Capricorn (Fig. 1). The predominant climate is subtropical with humid temperate weather, having an average temperature of > 22°C during the hottest and < 18° C during the coldest months. Northern (23°19'00"S; 51°22'00"W-GR) region is characterized as a mesothermic humid subtropical climate with rainy hot summers (December to February, average > 22°C), and sporadic frost during winters (May to July, average < 18°C) (PARANA ON LINE, 2007).



**Figura 1** – Sampling sites of corn in Cambará (1) and Bandeirantes (2) in the North region of Paraná State

### *Sampling*

A total of 490 freshly harvested corn (*Zea mays* L.) samples were collected at three points of corn productive chain from the North of Paraná State, during the February-April 2003 crop and the March-May 2004 crop. Random sampling (n=245) was performed immediately after harvesting (100 samples), at the



delivery post of cooperatives (100 samples) and before drying process (45 samples). In order to facilitate samples collected immediately after harvesting, at the delivery post of cooperatives and before drying process were denominated field, reception and pre-drying samples, respectively. Corn kernels were taken randomly from 9 to 12 truck bin sites (immediately after harvesting and at the delivery post of cooperatives) and pooled (10 kg), following the sampling protocol established by the Brazilian guidelines (BRASIL, 1976). Corn samples from the same truck were collected immediately after harvesting and at the delivery post of cooperatives. The pre-drying samples were collected from the mat that leads the corn kernels to the drier, i.e., 650 g each 30 min and pooled (10 kg). After homogenization, the corn samples (1 kg) were immediately sent to the laboratory and maintained at 4°C for maximum 7 days for microbiological analysis. For fumonisin determination, 200g of each corn sample were ground to 50 mesh and stored at - 20°C.

#### *Mycoflora analysis*

Two hundred grams of each corn sample were ground to 50 mesh. Sub-samples (10 g) of ground corn were then blended with 90 ml of sterile 0.1% peptone water (v/v), and serial dilutions were carried out with 9.0 ml of the same diluent to 10<sup>-6</sup>. One millilitre of each dilution was transferred into a Petri dish and pour-plated with potato dextrose agar (PDA, pH 4.0) added to 50 µg/ml chloramphenicol and incubated at 25°C for 6 days. After total fungal colony count, genera identification was carried out according to Nelson et al. (1983), Singh et al. (1991), and Samson et al. (1995).

#### *Fumonisin analysis*

Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> were analyzed according to Shephard et al. (1990) with some modification (Ueno et al., 1993). The corn kernels (200 g) were ground to 50 mesh in a laboratory mill, and 10 g powder was mixed with 30 mL methanol:water (3:1, v/v). After standing for 10 min at room temperature, the suspension was shaken at 150 rpm for 30 min and centrifuged at 4500 x g for 10 min. The crude extract (1.0 mL) was applied to preconditioned Sep Pak accell plus QMA cartridge (Waters Co., Ltd.). After washing the cartridge with methanol-water (3:1, 6 mL) followed by methanol (3 mL), fumonisins were eluted with 10 mL methanol containing 0.5% acetic acid. The eluate was evaporated to dryness under a stream

of nitrogen at 45°C, the residue was dissolved in methanol-water (3:1, 800 µL) and a 200 µL aliquot dried under nitrogen. After derivatization with 200 µL O-phthaldialdehyde reagent (40 mg OPA, 1 mL methanol, 5 mL 0.1M sodium borate and 50 µL 2-mercaptoethanol), HPLC injections were made within 1 min. Fumonisin was analyzed by a reversed-phase isocratic HPLC system (Shimadzu LC-10 AD pump and RF 535 fluorescence detector), using a Shim-pack CLC-ODS (M) column (4.6 x 250 mm, Shimadzu). Excitation and emission wavelengths were 335 nm and 450 nm, respectively. The eluent was CH<sub>3</sub>OH:0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (80:20, v/v) adjusted to pH 3.3 with ortho-phosphoric acid. The flow rate was 1 mL/min. The detection limits for FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> were 27.5 ng/g and 30.0 ng/g, respectively. The recoveries of FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> from spiked corn in the range 150-400 ng/g FB<sub>1</sub> and 250-450 ng/g FB<sub>2</sub> averaged 106.3% (mean CV 8%) and 96.9% (mean CV 10%), respectively, based on duplicate spiking and duplicate analyses.

#### *Statistical analysis*

Total fungal colony count, *Fusarium* sp. count and fumonisin level differences among field, reception and pre-drying samples were statistically evaluated using ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test ( $p < 0.05$ ). The correlation between the time interval (from the harvesting to pre-drying step) and fumonisin levels was analysed by Pearson's correlation test ( $p < 0.05$ ). Statistical analysis was performed by the 'Statistica' software version 6.0 (Stat Soft, Inc.).

#### *Results and discussion*

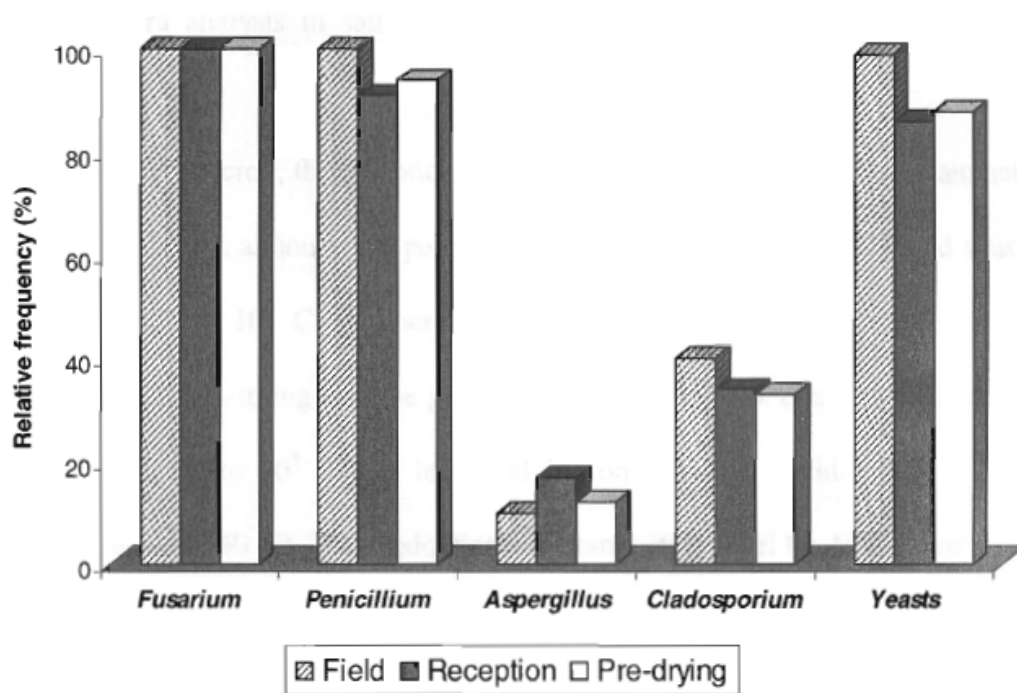
The relative frequency of main fungal genera in 445 freshly harvested corn samples (2003 and 2004 crop) from three different points of corn productive chain (field, reception and pre-drying step) is shown in Figures 2 and 3, whereas the counting of the *Fusaria*, *Penicillia* and *Aspergilli* groups in four contamination levels (CFU/g) is discriminated in Table 1. The two crops showed a similar profile concerning the fungal frequency. *Fusarium* sp. was the prevalent genera (100%) for the three sampling sites from both crops, followed by *Penicillium* sp. which was detected in 100%, 91% and 94% of samples from field, reception and pre-drying step (2003 crop), respectively. Contamination frequency by *Aspergillus* sp. was lower and ranged from 10 to 17% (2003 crop) and from 7 to 8% (2004 crop).

**Table 1** – Levels of fungal contamination in corn samples from the North region of Paraná State (n=445)

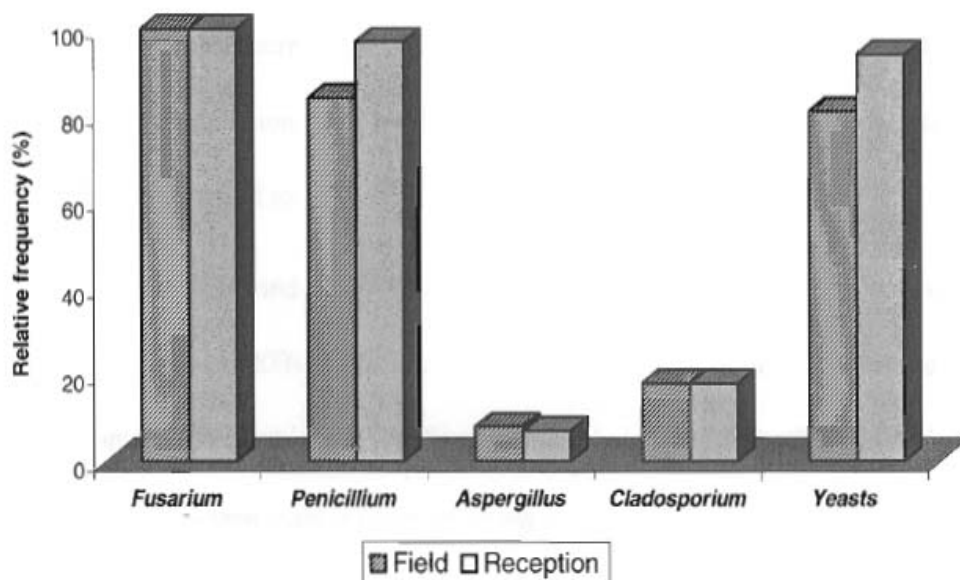
Crop	Sampling site	CFU/g	Percentage of samples with contamination			
			< 10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> - <10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> - <10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup> - < 10 <sup>6</sup>
2003	Field (n= 100)	*Total	1	18	57	24
		<i>Fusarium</i> sp.	15	39	38	8
		<i>Penicillium</i> sp.	15	61	24	—
		<i>Aspergillus</i> sp.	5	3	2	—
	Reception (n= 100)	*Total	1	14	50	35
		<i>Fusarium</i> sp.	12	40	40	8
		<i>Penicillium</i> sp.	10	50	31	—
		<i>Aspergillus</i> sp.	10	7	—	—
	Pre-drying (n= 45)	*Total	—	17	60	23
		<i>Fusarium</i> sp.	12	38	43	7
		<i>Penicillium</i> sp.	10	55	27	2
		<i>Aspergillus</i> sp.	6	6	—	—
2004	Field (n=100)	*Total	12	11	60	17
		<i>Fusarium</i> sp.	11	42	43	4
		<i>Penicillium</i> sp.	3	62	19	—
		<i>Aspergillus</i> sp.	5	3	—	—
	Reception (n=100)	*Total	9	9	59	23
		<i>Fusarium</i> sp.	14	34	43	9
		<i>Penicillium</i> sp.	21	59	16	1
		<i>Aspergillus</i> sp.	2	4	1	—

\* Total counting of moulds and yeasts

The high frequency of *Fusarium* sp. and *Penicillium* sp. (Figures 2 and 3, Table 1) is in accordance with the data reported by Ono *et al.* (2002) and Orsi *et al.* (2000). Ono *et al.* (2002) detected *Fusarium* sp. and *Penicillium* sp. in 100% corn samples (n= 36) from the Northern region of Paraná State, Brazil. Orsi *et al.* (2000) evaluated the mycoflora in 195 corn samples from São Paulo State, Brazil, and showed predominance of *Fusarium* sp. (57%) and *Penicillium* sp. (40%). The low frequency of *Aspergillus* sp. is in accordance to Christensen and Sauer (1982), who classified it as predominant fungi at storage, suggesting a negative correlation between *Aspergillus* sp. and *Fusarium* sp. When they are co-contaminating corn kernels (Marin *et al.*, 1995).



**Figure 2** – Relative frequency of fungi isolation in field corn samples (n=100), reception (n=100) and pre-drying (n=45) step from the North region of Paraná State (2003 crop).



**Figure 3** – Relative frequency of fungi isolation in freshly harvested corn samples from field (n=100) and reception of cooperative (n=100) from the North region of Paraná State (2004 crop).

Taking into account that there was no significant difference ( $p \leq 0.05$ ) in total mould and yeast counting among field, reception and pre-drying samples (2003 crop) by Tukey's test, mycoflora analysis in samples from 2004 crop was carried out only for field and reception samples.

In the 2003 crop, the reception samples ( $n=100$ ) showed similar contamination levels to the field samples, although the percentage of samples with total mould and yeast counting in a range of  $10^5$  to  $10^6$  CFU/g increased from 24% (field samples) to 35% in the reception samples. At the pre-drying step the percentage of *Fusarium* sp. contaminated samples (43%) in a range of  $10^4$  to  $10^5$  CFU/g increased in comparison to field samples (39.9 %) and reception samples (40 %). The predominant contamination level by *Aspergillus* sp. was  $< 10^3$  CFU/g for the three sampling sites ranging from 50% to 59%.

Concerning to 2004 crop the percentage of contaminated samples in the range of  $10^5$  to  $10^6$  CFU/g also increased according to the sampling site, from 17% in the field to 23% in the reception for total mould and yeast counting, while for *Fusarium* sp. the percentage of contaminated samples increased from 4% (field) to 9% (reception). In the field samples, the predominant contamination level by *Aspergillus* sp. was  $< 10^3$  CFU/g (63% samples), but at the reception it increased to  $10^3 - 10^4$  CFU/g (57% samples).

Fumonisin ( $FB_1$  and  $FB_2$ ) levels in freshly harvested corn samples belonging to 2003 ( $n=245$ ) and 2004 ( $n=200$ ) crops are shown in Table 2. Fumonisin were detected in all samples from the three points of productive chain belonging to both 2003 and 2004 crops. Fumonisin levels ranged from 0.11 to 15.32  $\mu\text{g/g}$  (mean of  $2.48 \pm 2.89$   $\mu\text{g/g}$ ) in field samples, from 0.16 to 15.90  $\mu\text{g/g}$  (mean of  $2.70 \pm 2.65$   $\mu\text{g/g}$ ) in reception samples and from 0.02 to 18.78  $\mu\text{g/g}$  (mean of  $3.61 \pm 4.06$   $\mu\text{g/g}$ ) in pre-drying samples belonging to 2003 crop. Samples from 2004 crop showed lower contamination and fumonisin levels ranged from 0.07 to 4.78  $\mu\text{g/g}$  (mean of  $1.02 \pm 0.77$   $\mu\text{g/g}$ ) in field samples, from 0.03 to 4.09  $\mu\text{g/g}$  (mean of  $1.11 \pm 0.99$   $\mu\text{g/g}$ ) in reception samples and from 0.11 to 11.21  $\mu\text{g/g}$  (mean of  $1.57 \pm 2.03$   $\mu\text{g/g}$ ) in pre-drying samples. These fumonisin levels (Table 2) are similar to those reported by Avantaggiato et al. (2002), but lower than those obtained by Ono et al. (2002) and Ono et al. (2006). Avantaggiato et al. (2002) detected fumonisin levels ranging from 0.01 to 19.69  $\mu\text{g/g}$  (mean of 2.69  $\mu\text{g/g}$ ) in 24 out of 25 corn samples from Central region of Italy. Ono et al. (2002) evaluated fumonisin occurrence in 150

freshly harvested corn samples from Central-Southern, Central-Western and Northern regions of the State of Paraná, Brazil, and detected fumonisins in 147 (98%) samples at a concentration range of 0.096 to 22.6  $\mu\text{g/g}$ . Mean fumonisin levels in Central-Western and Northern regions were 5.08  $\mu\text{g/g}$  and 9.85  $\mu\text{g/g}$ , respectively. Ono et al. (2006) analysed 109 freshly harvested corn samples from Paraná State, Brazil and detected fumonisin levels ranging from 0.13 to 20.38  $\mu\text{g/g}$ .

**Table 2** – Fumonisin levels\* in freshly harvested corn samples from field, reception and pre-drying step (2003 and 2004 crops) from the North region of Paraná State.

Crop	Sampling site	Positive samples	FB <sub>1</sub> ( $\mu\text{g/g}$ )		Positive samples	FB <sub>2</sub> ( $\mu\text{g/g}$ )		Total FB ( $\mu\text{g/g}$ )	
			**Mean	Range		**Mean	Range	**Mean	Range
2003	Field (n=100)	100%	1.81 <sup>a</sup> ± 2.12	0.11 – 12.68	84%	0.84 <sup>a</sup> ± 0.94	0.01 – 5.26	2.48 <sup>a</sup> ± 2.89	0.11 – 15.32
	Reception (n=100)	100%	1.99 <sup>a</sup> ± 2.04	0.16 – 11.83	91%	0.77 <sup>a</sup> ± 0.77	0.02 – 5.25	2.70 <sup>a</sup> ± 2.65	0.16 – 15.90
	Pre-drying (n=45)	100%	2.59 <sup>a</sup> ± 2.70	0.02 – 10.98	64%	1.51 <sup>a</sup> ± 1.60	0.07 – 7.89	3.61 <sup>a</sup> ± 4.06	0.02 – 18.78
2004	Field (n=100)	100%	0.78 <sup>a</sup> ± 0.62	0.07 – 4.17	68%	0.32 <sup>a</sup> ± 0.23	0.02 – 1.04	1.02 <sup>a</sup> ± 0.77	0.07 – 4.78
	Reception (n=100)	100%	0.89 <sup>a</sup> ± 0.74	0.03 – 3.56	51%	0.48 <sup>a</sup> ± 0.44	0.05 – 2.00	1.11 <sup>a</sup> ± 0.99	0.03 – 4.09
	Pre-drying (n=45)	100%	1.13 <sup>a</sup> ± 1.49	0.14 – 7.74	62%	0.73 <sup>a</sup> ± 0.81	0.06 – 3.47	1.57 <sup>a</sup> ± 2.03	0.11 – 11.21

Total FB = FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>

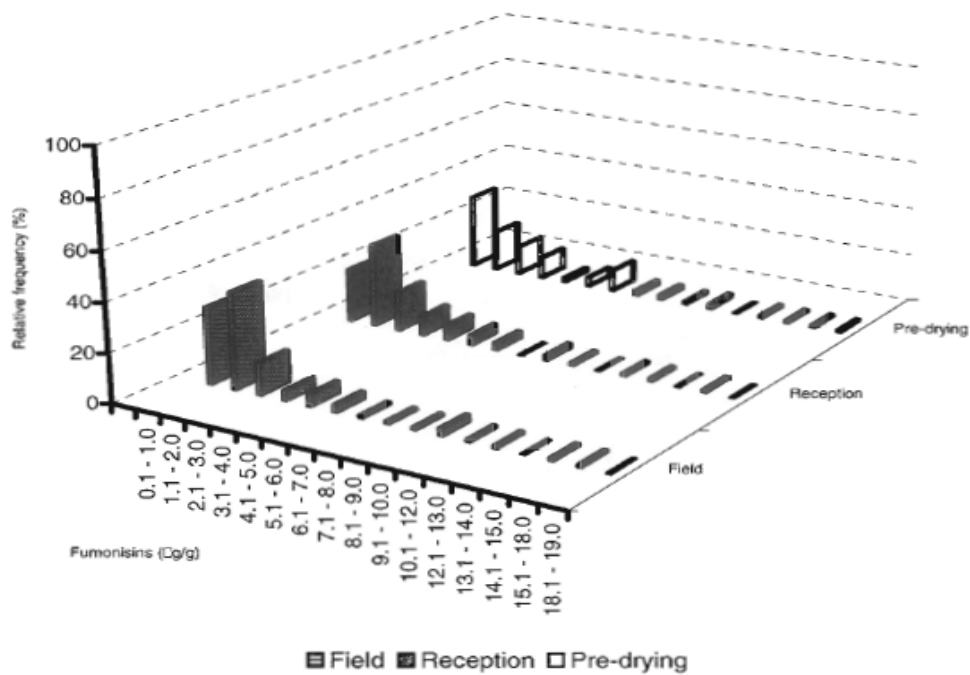
\*Detected by HPLC

Detection limit FB<sub>1</sub> = 27.5 ng/g

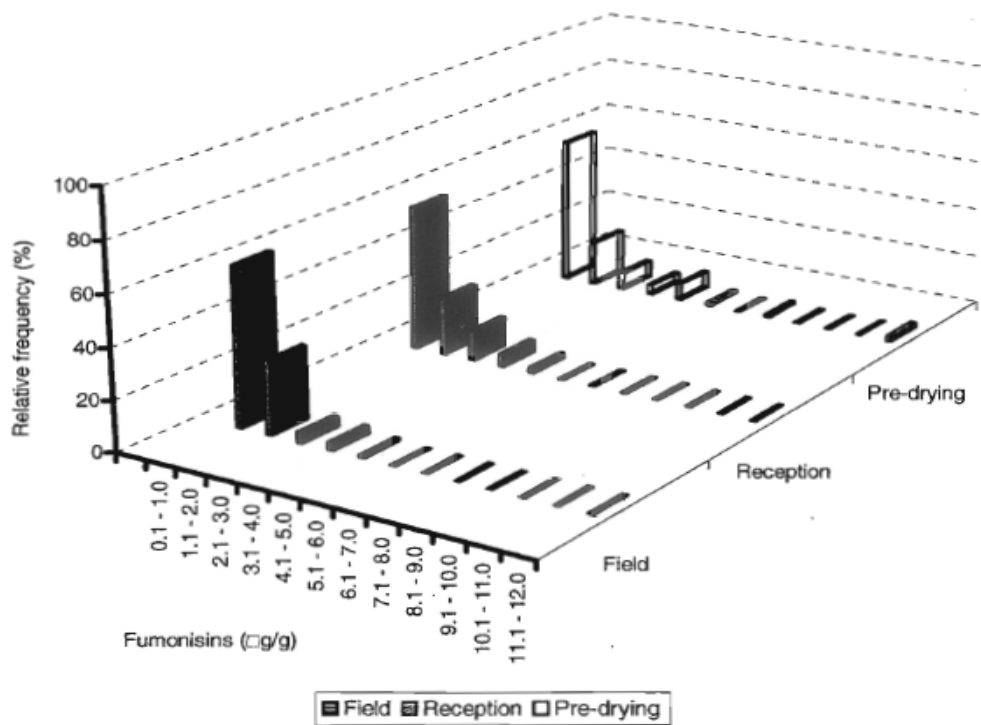
Detection limit FB<sub>2</sub> = 39.4 ng/g

\*\* Means followed by the same letter indicate no significant difference by Tukey's test ( $p < 0.05$ )

As shown in Figures 4 (2003 crop) and 5 (2004 crop) low fumonisin levels ranging from 0.1 to 2.0  $\mu\text{g/g}$  were predominant in samples from the three points of productive chain. Samples belonging to 2004 crop showed lower fumonisin levels compared to 2003 crop with 92% field samples in a contamination range from 0.1 to 2.0  $\mu\text{g/g}$ .



**Figure 4** – Relative frequency of fumonisin (FB<sub>i</sub> + FB<sub>2</sub>) levels in corn samples from the field (n=100), reception of cooperative (n=100) and pre-drying step (n=45) from the North region of Paraná State (2003 crop).



**Figure 5** – Relative frequency of fumonisin (FB<sub>i</sub> + FB<sub>2</sub>) levels in corn samples from the field (n=100), reception of cooperative (n=100) and pre-drying step (n=45) from the North region of Paraná State (2004 crop).

Although the legal limits for fumonisins had not been established, Food and Drug Administration (FDA) recommend the maximum limit of 2.0  $\mu\text{g/g}$  and 4.0  $\mu\text{g/g}$  for corn bran and pasta production, respectively, intended for human consumption (Avantaggiato et al., 2002). Considering 4.0  $\mu\text{g/g}$  as the maximum fumonisin level recommended for pasta production, 186 samples (76 %) from 2003 crop and 237 samples (96.7 %) from 2004 crop were safe for human consumption. On the other hand, the Mycotoxin Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians fixed advisory levels at 5.0, 10.0 e 50.0  $\mu\text{g/g}$  for equine, swine and cattle feed, respectively (Munkvold & Desjardins, 1997). Taking into account the maximum limit recommended for swine (10.0  $\mu\text{g/g}$ ), 226 samples (92.2 %) from 2003 crop and 243 samples (99.2 %) from 2004 crop were adequate as ingredient for feed production.

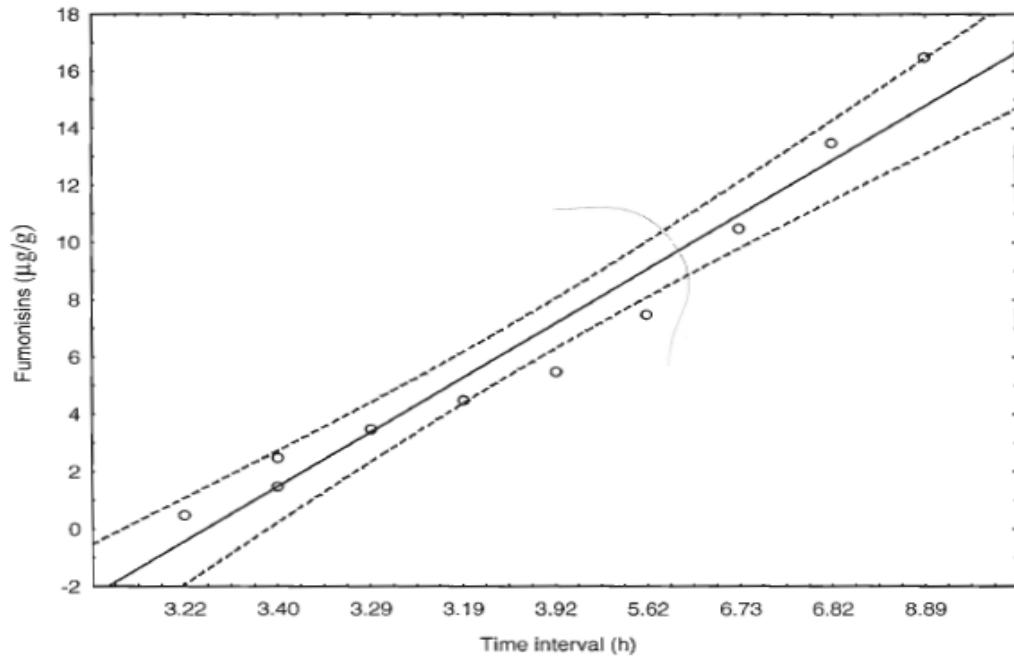
**Table 3** – Time interval from harvesting to pre-drying step and fumonisin contamination in corn samples from the North region of Paraná State.

total FB ( $\mu\text{g/g}$ )	2003 Crop				2004 Crop			
	Time interval (h)			n	Time interval (h)			n
	from field to cooperative	from reception to pre-drying	Total time		from field to cooperative	from reception to pre-drying	Total time	
0.1 – 1.0	1.14	2.08	3.22	50	0.88	1.62	2.50	148
1.1 – 2.0	1.31	2.09	3.40	59	1.02	1.96	2.98	60
2.1 – 3.0	1.25	2.15	3.40	23	0.98	1.96	2.94	19
3.1 – 4.0	1.22	2.07	3.29	11	1.12	1.90	3.02	10
4.1 – 5.0	0.85	2.34	3.19	7	1.07	3.44	4.51	6
5.1 – 6.0	1.10	2.82	3.92	5	-	-	-	-
6.1 – 9.0	1.90	3.72	5.62	3	2.50	4.91	7.41	1
9.1–12.0	2.20	4.53	6.73	11	2.83	6.16	8.99	1
12.1–15.0	1.78	5.04	6.82	3	-	-	-	-
15.1- 18.0	2.25	6.64	8.89	3	-	-	-	-

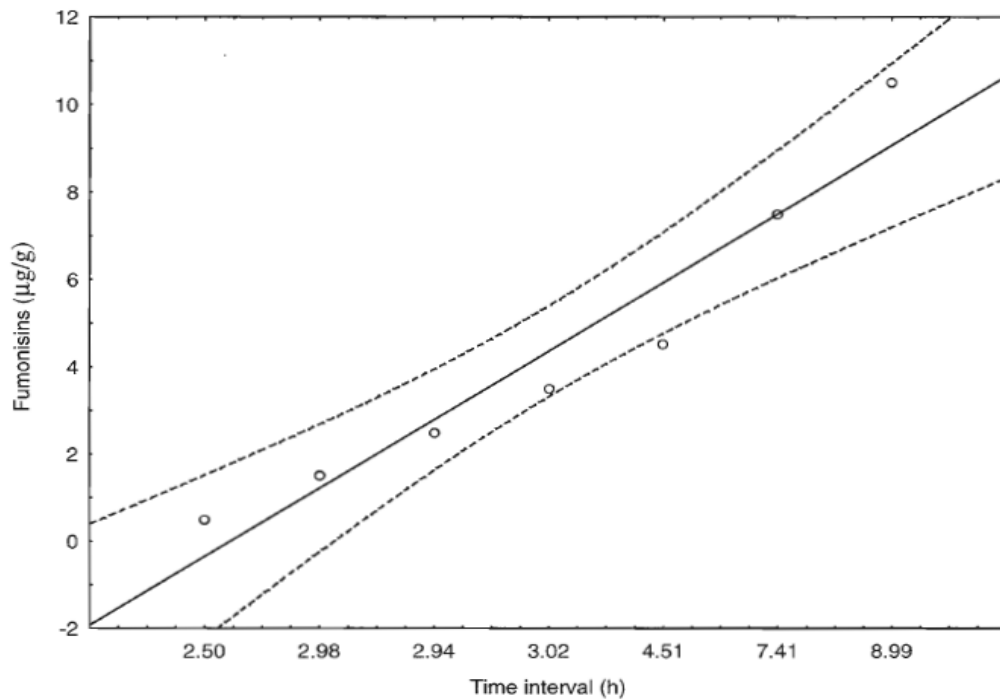
n = number of samples

Total FB =  $\text{FB}_1 + \text{FB}_2$





**Figure 6** – Correlation between the time interval from the harvesting to the pre-drying step and fumonisin levels ( $FB_1 + FB_2$ ) in freshly harvested corn samples ( $n=175$ ) from the North region of Paraná State (2003 crop). Linear regression equation  $y = -192.19 + 1.898x$  was obtained with correlation coefficient ( $\rho$ ) of 0.96 ( $p < 0.05$ ).



**Figura 7** – Correlation between the time interval from the harvesting to the pre-drying step and fumonisin levels ( $FB_1 + FB_2$ ) in freshly harvested corn samples ( $n=245$ ) from the North region of Paraná State (2004 crop). Linear regression equation  $y = -159.071 + 1.571x$  was obtained with correlation coefficient ( ) of 0.96 ( $p < 0.05$ ).

The time interval from the corn harvesting to pre-drying step and

fumonisin levels are shown in Table 3. The mean fumonisin levels increased gradually from  $\leq 5.0 \mu\text{g/g}$  to  $18.78 \mu\text{g/g}$  as the time interval from the harvesting to the pre-drying step increased from 3.2 to 8.9 hours (2003 crop). The same profile was observed for samples from 2004 crop. i.e., the mean fumonisin levels increased from  $\leq 5.0 \mu\text{g/g}$  to  $12.0 \mu\text{g/g}$  as the time interval from 3.0 to 8.9 hours. Fumonisin levels and the time interval ( $p=0.96$ ) showed positive correlation ( $p < 0.05$ ) (Figures 6 and 7). These results indicate that delay in drying process can increase fumonisin levels; therefore adequate post-harvest management is essential for assuring the corn quality in order reduce economic losses and minimize potential risks to human and animal health.

### Acknowledgements

The authors thank the FINEP, CNPq (the Brazilian Government Organization for grant aid and fellowship to Brazilian researchers), the Araucária Foundation, Paraná Fund/SETI and CAPES (Coordination for Formation of High Level Professionals) for the financial support. They are also grateful to ADETEC (Agency for Technological Development of Londrina city and Region) for project management.

### References

ABIMILHO – Associação Brasileira das Indústrias de Milho, 2006. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br>>. Accessed 2006 Jan 20.

Ah Seo J, Won Lee Y. 1999. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Applied Environmental Microbiology**, 65:1331-1334.

Avantaggiato G, Quaranta F, Desiderio E, Visconti A. 2002. Fumonisin contamination of maize hybrids visibly damaged by *Sesamia*. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 83:13-18.

Bezuidenhout SC, Gelderblom WCA, Gorst-Allman CP, Horak RM, Marasas WFO, Spiteller G, Vleggaar R. 1988. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal Chemical Society Chemistry Communications** 743-745.

BRASIL, Portaria n. 845 de 8 de novembro de 1976. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília (DF), 30 nov. 1976.

Christensen CN & Sauer DB. 1982. Mycoflora In: Christensen, C.N. ed. **Storage of cereal grains and their products**. Minnesota, American Association of Cereal Chemists p. 219-240.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. **Milho**: análise perspectiva do mercado-safra 2005/2006. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Accessed 2006 Jan 20.

Desjardins AE, Plattner RD & Nelson PE. 1994. Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* strains from maize in Northeast Mexico. **Applied Environmental Microbiology** 60:1695-1697.

Gelderblom WCA, Sample E, Marasas WFO. 1992. The cancer initiating potential of the fumonisins B mycotoxins. **Carcinogenesis** 13: 433-437.

Marasas WFO, Kellerman TS, Gelderblom WCA, Coetzer JAW, Thiel PG, Van Der Lugt JJ. 1988. Leukoencephalomalacia in horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal Veterinary Research** 55: 197-203.

Marín S, Sanchis V, Magan N. 1995. Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. **Canadian Journal Microbiology** 41:1063-1070.

Miller JD. 1996. Global significance of mycotoxins and phycotoxins. In: IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Rome, Instituto Superiore di Sanità p. 31.

Munkvold GP, Desjardins AE. 1997. Fumonisins in maize: can we reduce their occurrence? **Plant Disease** 81: 556-565.

Nelson PE, Tousson TA, Marasas WFO. 1983. *Fusarium* species - An illustrated manual for identification. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press.

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

Norred WP, Voss KA. 1994. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. *Journal of Food Protection*, Ames. 57: 522-527.

Ono EYS, Biazon L, Da Silva M, Vizoni E, Sugiura Y, Ueno Y and Hirooka EY. 2006. Fumonisins in corn: correlation with *Fusarium* sp. Count, damaged kernels, protein and lipid content. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 49: 63-71.

Ono EYS, Sasaki EY, Hashimoto EH, Hara, LN, Corrêa B, Itano EN, Sugiura T, Ueno Y and Hirooka EY. 2002. Post-harvest storage of corn: effect of beginning moisture content on mycoflora and fumonisin contamination. **Food Additives and Contaminants** 19: 1081-1090.

Orsi RB, Corrêa B, Pozzi CR, Schammas EA, Nogueira JR, Dias SMC, Malozzi MAB. 2000. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research** 36: 75-87.

PARANÁ CIDADE [on line]. **File available through**. Disponível em: <<http://www.celepar.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=41>>. Accessed 2007 Jan 13.

Ross PF, Nelson PE, Richard JL, Osweiler GD, Rice LG, Plattner RD, Wilson TM. 1990. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolate associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. **Applied Environmental Microbiology** 56: 3225-3226.

Samson RA, Hoeksstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O. 1995 **Introduction to food-borne fungi**. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures (4.ed.).

Shephard GS, Sydenham EW, Thiel PG, Gelderblom WCA. 1990. Quantitative determination of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal Liquid Chromatography** 13: 2077-2087.

Singh K, Frisvad JC, Thrane U, Mathur SB. 1991. **An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins**. Hellerup/Denmark/: Danish Government.

Thiel PG, Marasas WFO, Sydenham EW, Shephard GS, Gelderblom WCA & Nieuwenhuis JJ. 1991. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. **Applied Environmental Microbiology** 57: 1089-1093.

Ueno Y, Iijima K, Wang S-D, Sugiura Y, Sekijima M, Tanaka T, Chen C, Yu S-Z. 1997. Fumonisins as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: A 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. **Food and Chemical Toxicology** 35: 1143-1150.

Ueno Y, Aoyama S, Sugiura Y, Wang DS, Lee US, Hirooka EY, Hara S, Karki T, Chen G, Yu SZ. 1993. A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. **Mycotoxin Research** 9: 27-34.

Weibking T, Ledoux DR, Bermudez AJ, Turk JR, Rottinghaus GE, Wang E, Merrill Jr AH. 1993. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B<sub>1</sub>, on the young broiler chick. **Poultry Science** 72: 456-466.

## ARTIGO B: Mycotoxicological quality evaluation of corn samples used by processing industries in the Northern region of Paraná State, Brazil

### Abstract

In this study corn quality regarding fungal and fumonisin contamination of 870 freshly harvested samples used as raw material by corn processing industries in the Northern region of Paraná State, Brazil (2003 and 2004 crops) was evaluated. Sampling was carried out at two points of the corn producing chain, i.e., at reception by the processing industry (n=300) and the pre-drying step (n=135) for each crop. Corn samples were frequently contaminated with *Fusarium* sp. (100%) and *Penicillium* sp. (84,1 to 95,3%), when compared to *Aspergillus* sp. (5,6 to 19,8%). Fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) was detected in all samples from the two points of the corn producing chain belonging to both crops. FB<sub>1</sub> levels ranged from 0.02 to 11.83 µg/g in reception samples and from 0.02 to 10.98 µg/g in pre-drying samples of the 2003 crop. Samples from the 2004 crop showed FB<sub>1</sub> levels ranging from 0.03 to 12.04 µg/g in reception samples and from 0.06 to 7.74 µg/g in pre-drying samples. FB<sub>2</sub> levels ranged from 0.02 to 5.25 µg/g in reception samples and from 0.01 to 7.89 µg/g in pre-drying samples (2003 crop), while in samples from 2004 crop FB<sub>2</sub> levels ranged from 0.02 to 6.12 µg/g in the reception samples and from 0.05 to 3.47 µg/g in the pre-drying samples. Low fumonisin levels were detected in most of the corn samples received by processing industries in the Northern region of Paraná State. These results ratified the importance of constant monitoring control throughout corn production for hazard minimization and compliance with trade requirements.

**Keywords:** Fumonisin. Corn producing chain. Mycoflora

### Introduction

Agricultural commodities intended for human and animal consumption are frequently exposed to fungal contamination (Lázzari, 2001).

*Fusarium verticillioides* is the prevalent seed-borne fungus of corn and one of the main producers of fumonisins, a group of mycotoxins that cause severe economic losses and several diseases in animals. Fumonisin induce leukoencephalomalacia in equines (Marasas, Kellerman, Gelderblom, Coetzer, Thiel & Van Der Lugt, 1988), pulmonary edema in swine (Ross et al. 1990), immunosuppression and reduced weight gain in poultry (Weibking et al. 1993) and hepatocarcinoma in rats (Norred & Voss, 1994). In humans, high fumonisin levels in corn-based food have been associated with oesophageal cancer in China (Zhang et

al. 1997), South Africa (Marasas et al. 1981) and evaluated as one of the possible risk factors for primary liver cancer (Ueno et al. 1997).

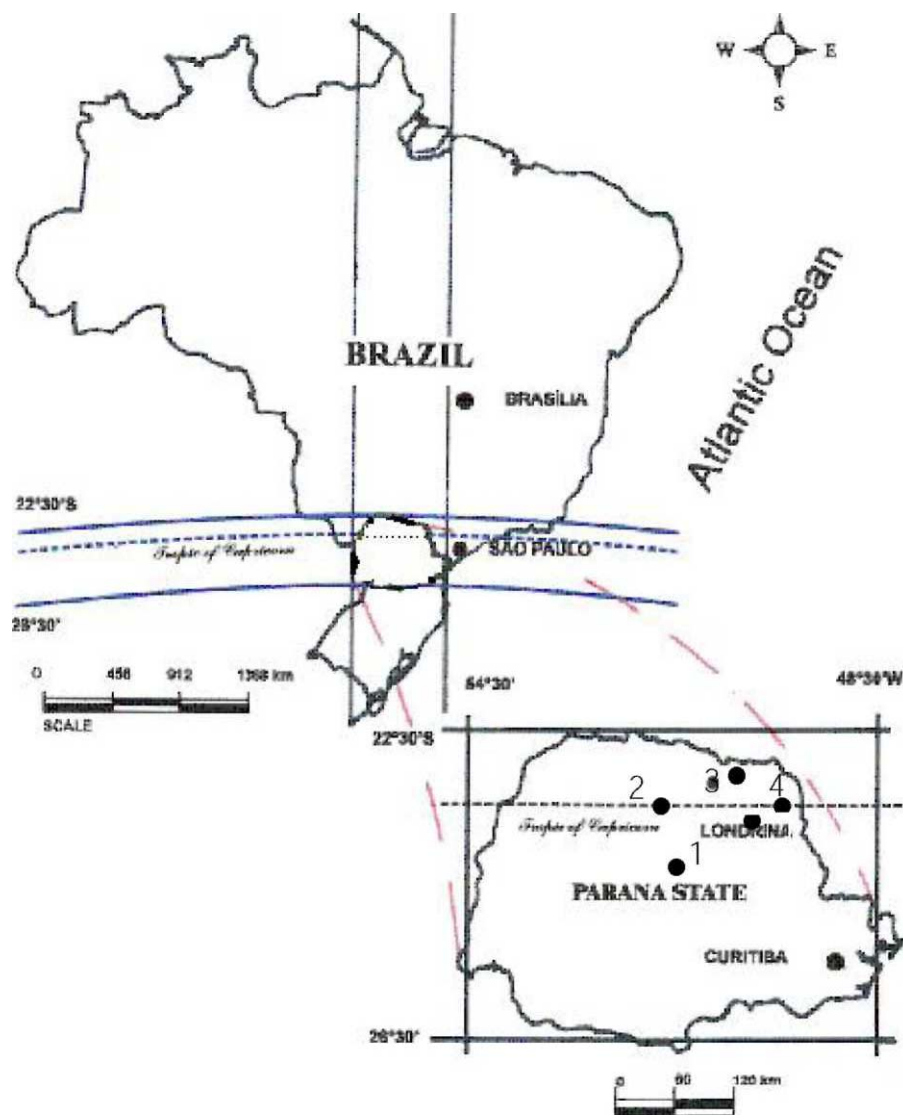
Fumonisin contamination occurs from the physiological maturity stage of corn until the storage, mainly in the interval between the post-harvest and pre-drying step (Lázzari, 2001). Ono et al. (2002) detected fumonisins in 100% of freshly harvested corn samples from the Northern region of Paraná State. Fumonisin production depends on biological (susceptible crop) and environmental factors, especially on regional climatic conditions during plant development and crop harvest (Ono et al. 1999).

Taking into account the unavoidable occurrence of *F. verticillioides* and further risks associated to fumonisins in corn, monitoring the producing chain is essential, as fumonisins can't be removed by the industrial processing. Therefore, the aim of this study was to evaluate the mycotoxicological quality of corn from the Northern region of Paraná State used as raw material by processing industries by monitoring the fungal contamination and fumonisin occurrence at two points of the producing chain.

## **Material and Methods**

### *Characterization of the studied area*

The State of Paraná comprises 199,570 km<sup>2</sup> and is located in Southern Brazil (24°30'S; 50°30'W), and bisected by the Tropic of Capricorn (Fig. 1). The predominant climate is subtropical with humid temperate weather, having an average temperature of > 22°C during the hottest and < 18° C during the coldest months. Northern (23°19'00"S; 51°22'00"W-GR) region is characterized as a mesothermic humid subtropical climate with rainy hot summers (December to February, average > 22°C), and sporadic frost during winters (May to July, average < 18°C) (Paraná on line, 2007).



**Figure 1** – Sampling sites of corn in Ortigueira (1), Apucarana (2), Bandeirantes (3) and Cambará (4) in the North region of Paraná State.

#### *Climatic data*

Climatic data (maximum temperature, mean temperature, minimum temperature, relative humidity, rainfall) of corn harvesting months from 2003 and 2004 crops were provided by the Ecophysiology area of the Agronomic Institute of Paraná (IAPAR).

#### *Sampling*

A total of 870 freshly harvested corn (*Zea mays* L.) samples were collected at two points of corn productive chain from the North of Paraná State,

during the February-April 2003 crop and the March-May 2004 crop. Random sampling (n=435) was carried out at the delivery post of three corn processing industries (n=300) and before drying process (n=135) from each crop. In order to facilitate samples collected at the delivery post of corn processing industries and before drying process were denominated reception and pre-drying samples, respectively. Corn kernels were taken randomly from 9 to 12 truck bin sites (at the delivery post of corn processing industries) and pooled (10 kg), following the sampling protocol established by the Brazilian guidelines (Brasil, 1976). The pre-drying samples were collected from the mat that leads the corn kernels to the drier, i.e., 650 g for each 30 min and pooled (10 kg). After homogenization, the corn samples (1 kg) were immediately sent to the laboratory and maintained at 4°C for maximum 7 days for microbiological analysis. For fumonisin determination, 200g of each corn sample were ground to 50 mesh and stored at -20°C.

#### *Mycoflora analysis*

Two hundred grams of each corn sample were ground to 50 mesh. Sub-samples (10 g) of ground corn were then blended with 90 ml of sterile 0.1% peptone water (v/v), and serial dilutions were carried out with 9.0 ml of the same diluent to 10<sup>-6</sup>. One millilitre of each dilution was transferred into a Petri dish and pour-plated with potato dextrose agar (PDA, pH 4.0) added to 50 µg/ml chloramphenicol and incubated at 25°C for 6 days. After total fungal colony count, genera identification was carried out according to Nelson et al. (1983), Singh et al. (1991), and Samson et al. (1995).

#### *Fumonisin analysis*

Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> were analyzed according to Shephard et al. (1990) with some modification (Ueno et al. 1993). The corn kernels (200 g) were ground to 50 mesh in a laboratory mill, and 10 g powder was mixed with 30 mL methanol:water (3:1, v/v). After standing for 10 min at room temperature, the suspension was shaken at 150 rpm for 30 min and centrifuged at 4500 x g for 10 min. The crude extract (1.0 mL) was applied to preconditioned Sep Pak accell plus QMA cartridge (Waters Co., Ltd.). After washing the cartridge with methanol-water (3:1, 6 mL) followed by methanol (3 mL), fumonisins were eluted with 10 mL methanol containing 0.5% acetic acid. The eluate was evaporated to dryness under a stream



of nitrogen at 45°C, the residue was dissolved in methanol-water (3:1, 800 µL) and a 200 µL aliquot dried under nitrogen. After derivatization with 200 µL O-phthalaldehyde reagent (40 mg OPA, 1 mL methanol, 5 mL 0.1M sodium borate and 50 µL 2-mercaptoethanol), HPLC injections were made within 1 min. Fumonisin was analyzed by a reversed-phase isocratic HPLC system (Shimadzu LC-10 AD pump and RF 535 fluorescence detector), using a Shim-pack CLC-ODS (M) column (4.6 x 250 mm, Shimadzu). Excitation and emission wavelengths were 335 nm and 450 nm, respectively. The eluent was CH<sub>3</sub>OH:0.1 M NH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (80:20, v/v) adjusted to pH 3.3 with ortho-phosphoric acid. The flow rate was 1 mL/min. The detection limits for FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> were 27.5 ng/g and 30.0 ng/g, respectively. The recoveries of FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> from spiked corn in the range 150-400 ng/g FB<sub>1</sub> and 250-450 ng/g FB<sub>2</sub> averaged 106.3% (mean CV 8%) and 96.9% (mean CV 10%), respectively, based on duplicate spiking and duplicate analyses.

#### *Statistical analysis*

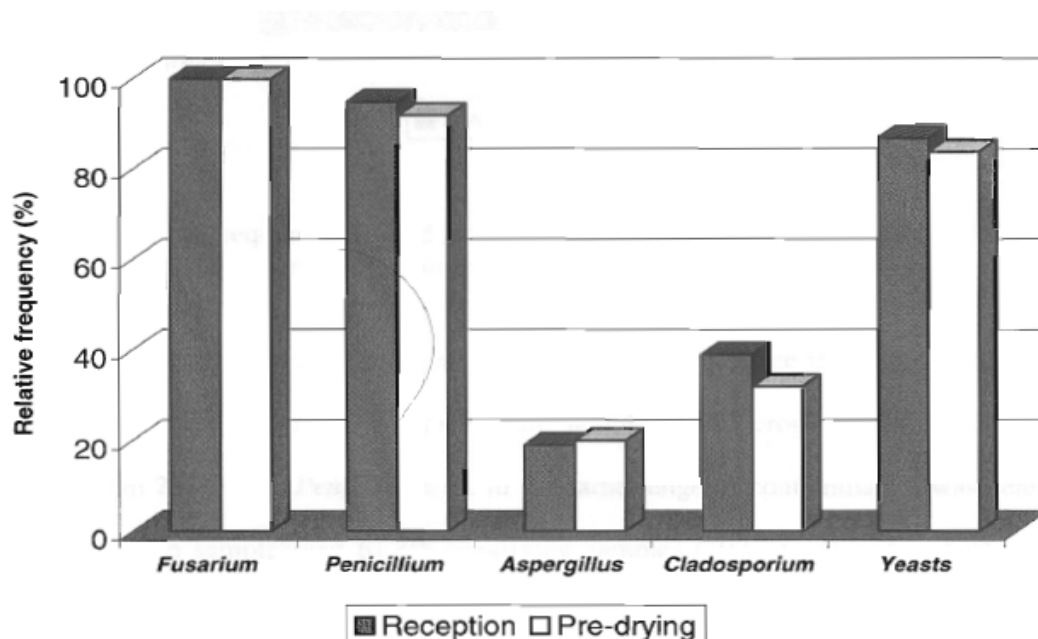
Total fungal colony count and fumonisin level differences between reception and pre-drying samples, as well as climatic data differences among four sampling sites and crop year were statistically evaluated using ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test ( $p < 0.05$ ). Fumonisin level differences among the four sites and crop year were evaluated by t-test ( $p < 0.05$ ). Statistical analysis was performed by the 'Statistica' software version 6.0 (Stat Soft, Inc.).

#### *Results and discussion*

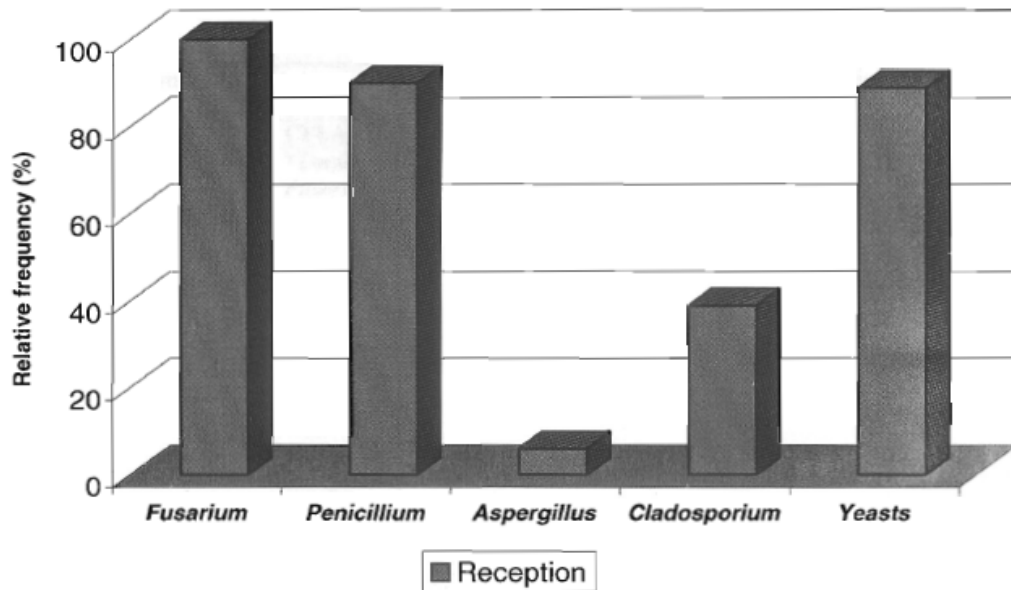
The relative frequency of the main fungal genera in 615 freshly harvested corn samples from 2003 (n=435) and 2004 (n=180) crops is shown in Figures 1 and 2. The mycoflora profile was similar at the two points of the corn productive chain (reception and pre-drying step). *Fusarium* sp. was detected in 100% samples from both crops, while *Penicillium* sp. in 95,3% and 91,9% samples from reception and the pre-drying step (2003 crop) and 84,1% samples from reception (2004 crop). *Aspergillus* sp. frequency was lower when compared to *Fusarium* sp. and *Penicillium* sp. and was detected in 19,3% reception samples and 19,8% pre-drying samples (2003 crop). In 2004 crop *Aspergillus* sp. was detected in 5,6% reception samples. The high frequency of *Fusarium* sp. (Figures 1 and 2, Table 1)

was in accordance with the data reported by Van der Westhuizen et al. (2003) who evaluated the mycoflora in 76 freshly harvested corn samples from Santa Catarina State, Brazil, and detected *Fusarium* sp. in 93 % samples. The low frequency of *Aspergillus* sp. could be explained by the high number of competitive microorganisms, especially *Fusarium* sp. which occurred in 100% samples (Figures 1 and 2), and suppressed endophytic *Aspergillus* section *Flavi* overgrowth in corn grain (Ono et al. 1999). Zummo and Scott (1992) detected a small number of *A. flavus*-infected kernels, and consequent significantly lower aflatoxin concentration in corn inoculated with both fungi, when compared with controls inoculated with *A. flavus* alone. The authors concluded that *F. verticillioides* can inhibit *A. flavus* infection and decrease aflatoxin concentrations in inoculated kernels.

Taking into account that there was no significant difference ( $p < 0.05$ ) in the total mould and yeast counting between reception and pre-drying samples (2003 crop) by Tukey's test, mycoflora analysis in samples from 2004 crop was carried out only for the reception samples.



**Figure 2** – Relative frequency of fungi isolation in freshly harvested corn samples from reception of cooperative (n=300) and pre-drying (n=145) from the North region of Paraná State (2003 crop).



**Figure 3** – Relative frequency of fungi isolation in freshly harvested corn samples from reception of cooperative (n=180) from the North region of Paraná State (2004 crop).

As shown in Table 1, *Fusarium* sp. was detected in a range from  $10^3$  to  $10^4$  CFU/g in 40% reception samples and 37.8% pre-drying samples (2003 crop) and in 38.4% reception samples from 2004 crop. *Penicillium* sp. in the same range of contamination was detected in 56.5% reception samples and 61.3% pre-drying samples (2003 crop) and in 57% reception samples (2004 crop). *Aspergillus* sp. at a low level of contamination ( $<10^3$  CFU/g) was detected in 64% reception samples and 51.8% pre-drying samples (2003 crop).

**Table 1** – Levels of fungal contamination in corn samples from the North Region of Paraná State (n=615)

Crop	Sampling site	CFU/g	Percentage of samples with contamination			
			< 10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> - <10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> - <10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup> - < 10 <sup>6</sup>
2003	Reception (n=300)	*Total	1.0	17.6	55.0	26.4
		<i>Fusarium</i> sp.	15.0	40.0	38.0	7.0
		<i>Penicillium</i> sp.	10.5	53.6	29.6	1.6
		<i>Aspergillus</i> sp.	12.3	6.0	1.0	-
	Predrying (n=135)	*Total	-	11.1	58.5	30.4
		<i>Fusarium</i> sp.	16.3	37.8	37.0	8.9
		<i>Penicillium</i> sp.	6.6	56.3	26.6	2.4
2004	Reception (n=180)	<i>Aspergillus</i> sp.	10.3	8.1	0.7	0.7
		*Total	7.2	17.7	50.0	25.1
		<i>Fusarium</i> sp.	26.5	33.3	34.0	6.2
		<i>Penicillium</i> sp.	27.0	44.4	11.6	1.1
		<i>Aspergillus</i> sp.	2.8	2.2	0.6	-

\* Total counting of moulds and yeasts.

Fumonisin (FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub>) levels in freshly harvested corn samples from the reception (n=300) and pre-drying step (n=135) belonging to 2003 and 2004 crops are shown in Table 2. FB<sub>1</sub> was detected in all samples from the two points of productive chain belonging to both crops. FB<sub>1</sub> levels ranged from 0.02 to 11.83 µg/g (mean of 1.73 ± 1.76 µg/g) in reception samples and from 0.02 to 10.98 µg/g (mean of 2.17 ± 2.30 µg/g) in pre-drying samples belonging to 2003 crop. Samples from 2004 crop showed FB<sub>1</sub> levels ranging from 0.03 to 12.04 µg/g (mean of 1.13 ± 1.10 µg/g) in reception samples and from 0.06 to 7.74 µg/g (mean of 1.18 ± 1.30 µg/g) in pre-drying samples (Table 2). FB<sub>2</sub> levels ranged from 0.02 to 5.25 µg/g (mean of 0.67 ± 0.68 µg/g) in reception samples and from 0.01 to 7.89 µg/g (mean of 1.00 ± 1.12 µg/g) in pre-drying samples (2003 crop), while in samples from 2004 crop FB<sub>2</sub> levels ranged from 0.02 to 6.12 µg/g (mean of 0.56 ± 0.75 µg/g) in reception samples and from 0.05 to 3.47 µg/g (mean of 0.56 ± 0.55 µg/g) in pre-drying samples (Table 2). These results (Table 2) are similar to those reported by Zinedine et al. (2006), but lower than those obtained by Oruc et al. (2006) and Abbas et al. (2006). Zinedine et al. (2006) evaluated 20 corn samples from Morocco and detected a mean F<sub>Bi</sub> level of 1.93 µg/g in 50 % samples ranging from 0.06 to 5.96 µg/g. Oruc et al. (2006) analysed 19 corn samples from Turkey and detected fumonisins (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) in 100 % samples in a range from 0.80 to 356.8 µg/g (mean of 88.24 µg/g). Abbas et al. (2006) detected fumonisins in 100 % corn samples (n=65) from United States with levels ranging from 0.30 to 83.60 µg/g.

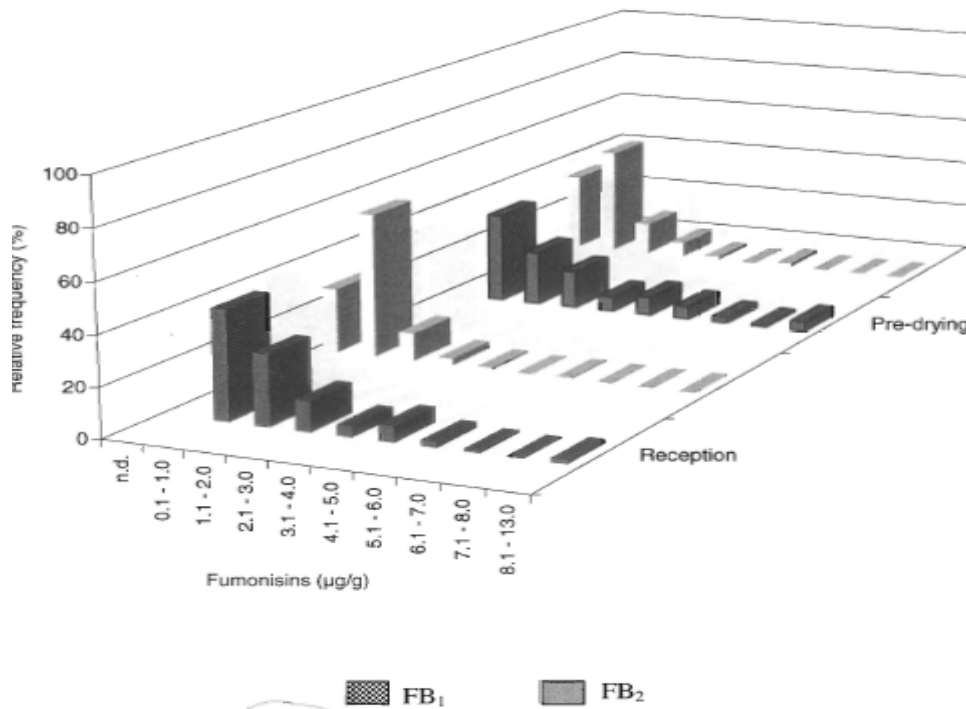
**Table 2** – Fumonisin levels\* in freshly harvested corn samples from reception and pre-drying step (2003 and 2004 crops) from the North region of Paraná State.

Crop	Sampling site	Positive samples	FB1 (Mg/g)		Positive samples	FB2 (Mg/g)		Total FB (Mg/g)	
			**Mean	Range		**Mean	Range	**Mean	Range
2003	Reception (n=300)	100%	1.73 <sup>a</sup> ± 1.76	0.02-11.83	.7%	0.67 <sup>a</sup> ± 0.68	0.02-5.25	2.24 <sup>a</sup> ± 2.23	0.02-15.90
	Pre-drying (n=135)	100%	2.17 <sup>a</sup> ± 2.70	0.02-10.98	.4%	1.00 <sup>a</sup> ± 1.12	0.01-7.89	2.87 <sup>a</sup> ± 3.16	0.02-18.78
2004	Reception (n=300)	100%	1.13 <sup>a</sup> ± 0.74	0.03-12.04	%	0.56 <sup>a</sup> ± 0.75	0.02-6.12	1.46 <sup>a</sup> ± 1.61	0.03-18.16
	Pre-drying (n=135)	100%	1.18 <sup>a</sup> ± 1.30	0.06-7.74	%	0.56 <sup>a</sup> ± 0.55	0.05-3.47	1.52 <sup>a</sup> ± 1.36	0.06-11.21

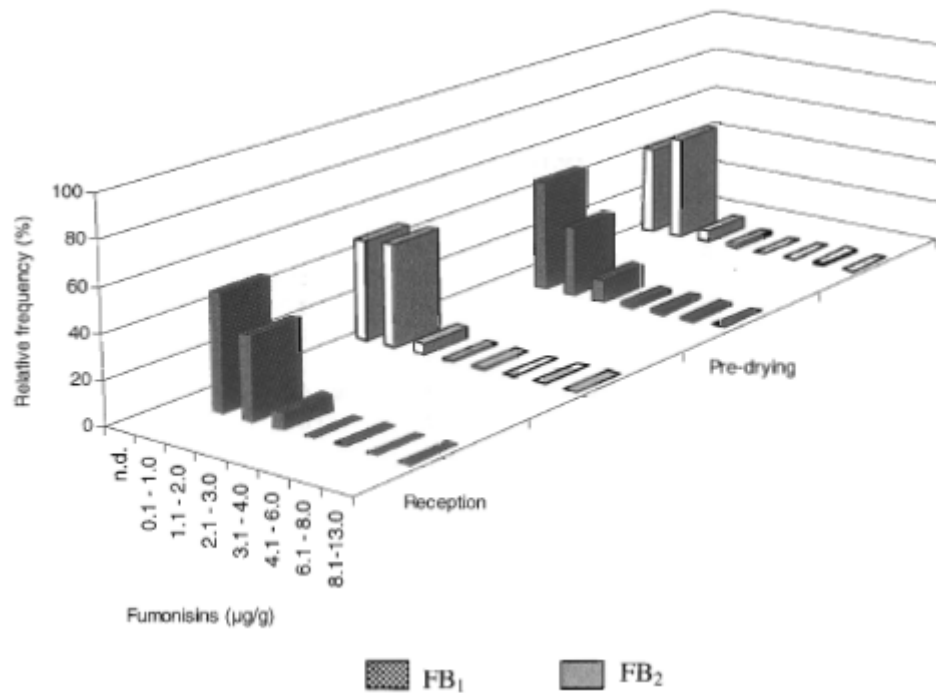
Total FB = FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub> \*Detected by HPLC Detection limit FB<sub>1</sub> = 27.5 ng/g Detection limit FB<sub>2</sub> = 39.4 ng/g

\*\* Means followed by the same letter indicate no significant difference by Tukey's test (p<0.05)

As shown in Figures 3 (2003 crop) and 4 (2004 crop) low fumonisin levels ranging from 0.1 to 2.0 ug/g were predominant in samples from the two points of corn producing chain.



**Figure 3** – Relative frequency of fumonisin (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) levels in corn samples from the reception of cooperative (n=300) and pre-drying step (n=135) from the North region of Paraná State (2003 crop).



**Figure 4** – Relative frequency of fumonisin (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) levels in corn samples from the reception of cooperative (n=300) and pre-drying step (n=135) from the North region of Paraná State (2004 crop).

The Food and Drug Administration (FDA) recommend the maximum limit of 2.0 µg/g and 4.0 µg/g for corn bran and pasta production, respectively, intended for human consumption (Avantaggiato et al. 2002). Considering 4.0 µg/g as the maximum fumonisin level recommended for pasta production, 351 samples (80.7%) from 2003 the crop and 430 samples (98.8 %) from the 2004 crop were safe for human consumption. On the other hand, the Mycotoxin Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians fixed advisory levels at 5.0, 10.0 and 50.0 µg/g for equine, swine and cattle feed, respectively (Munkvold & Desjardins, 1997). Taking into account the maximum limit recommended for swine (10.0 µg/g), 415 samples (95.4 %) from the 2003 crop and 432 samples (99.3 %) from the 2004 crop were adequate an ingredient for swine feed production.

**Table 3** – Time interval from reception to pre-drying step and fumonisin contamination in corn samples from the North region of Parana State

Total FB	Time interval (h)*			
	2003 Crop	n	2004 Crop	n
0.1 - 1.0	1.59	133	1.51	166
1.1-2.0	1.84	105	1.93	150
2.1-3.0	1.83	62	1.87	52
3.1-4.0	1.90	32	1.96	17
4.1-5.0	2.45	19	2.65	8
5.1-6.0	3.31	16	-	-
6.1-7.0	6.30	10	4.27	3
7.1- 8.0	4.73	4	4.16	1
8.1 -9.0	5.19	7	-	-
9.1-10.0	5.19	7	-	-
10.1-11.0	8.00	3	-	-
11.1 -12.0	-	-	5.58	2
12.1- 13.0	5.83		-	-
13.1 - 14.0	7.65		-	-
14.1 - 15.0	5.50		-	-
15.1 -18.0	7.50		-	-
18.1 -19.0	6.63		5.5	1

n = number of samples

Total FB = FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>

\* From reception to pre-

The time interval from the reception to pre-drying step and fumonisin levels are shown in Table 3. The mean fumonisin levels increased gradually from  $\leq 5.0$   $\mu\text{g/g}$  to 18.78  $\mu\text{g/g}$  as the time interval from the reception to the pre-drying step increased from 2.45 to 6.63 hours (2003 crop). The same profile was observed for samples from the 2004 crop. i.e., the mean fumonisin levels increased from  $\leq 5.0$   $\mu\text{g/g}$  to 18.16  $\mu\text{g/g}$  as the time interval increased from 2.65 to 5.5 hours (Table 3). These results indicate that the interval between harvesting to drying process should be reduced in order to prevent fungal growth and fumonisin production.

**Table 4** – Climatic data and fumonisin levels from four sites of the North region of Paraná State during the harvesting months (2003 and 2004 crops).

Sampling sites	Year	Month	n	Total FB** (ug/g)	Tmax			UR* (%)	Rainfall * (mm)
					* (°C)	Tmin* (°C)	Tmean* (°C)		
Cambará	2003	Feb	7	2.44 <sup>a</sup> ± 3.31	32.0 <sup>a</sup>	20.9 <sup>a</sup>	25.2 <sup>a</sup>	80.3 <sup>a</sup>	129 <sup>a</sup>
	2003	Mar	57	2.29 <sup>a</sup> ± 2.60	30.9 <sup>a</sup>	19.1 <sup>a</sup>	23.8 <sup>a</sup>	75.3 <sup>a</sup>	141 <sup>a</sup>
	2004	Mar	70	1.10 <sup>b</sup> ± 0.96	31.0 <sup>a</sup>	17.9 <sup>a</sup>	23.4 <sup>a</sup>	68.9 <sup>a</sup>	21 <sup>a</sup>
	2004	May	8	1.48 <sup>ab</sup> ± 1.26	23.2 <sup>a</sup>	13.2 <sup>a</sup>	17.2 <sup>a</sup>	82.3 <sup>a</sup>	156 <sup>a</sup>
Bandeirantes	2003	Feb	7	3.39 <sup>a</sup> ± 1.44	32.2 <sup>a</sup>	21.2 <sup>a</sup>	25.6 <sup>a</sup>	77.7 <sup>a</sup>	234 <sup>a</sup>
	2003	Mar	57	2.93 <sup>ab</sup> ± 2.60	31.1 <sup>a</sup>	19.5 <sup>a</sup>	24.4 <sup>a</sup>	71.3 <sup>a</sup>	87 <sup>a</sup>
	2004	Mar	6	1.10 <sup>bc</sup> ± 0.81	31.0 <sup>a</sup>	18.0 <sup>a</sup>	23.7 <sup>a</sup>	67.3 <sup>a</sup>	72 <sup>a</sup>
	2004	Apr	4	1.17 <sup>bc</sup> ± 0.82	29.4 <sup>a</sup>	18.5 <sup>a</sup>	22.9 <sup>a</sup>	74.4 <sup>a</sup>	96 <sup>a</sup>
	2004	May	12	1.21 <sup>bc</sup> ± 1.26	22.8 <sup>a</sup>	12.7 <sup>a</sup>	17.1 <sup>a</sup>	81.4 <sup>a</sup>	219 <sup>a</sup>
Apucarana	2003	Feb	66	2.27 <sup>a</sup> ± 2.29	30.5 <sup>a</sup>	20.1 <sup>a</sup>	24.5 <sup>a</sup>	78.6 <sup>a</sup>	147 <sup>a</sup>
	2003	Mar	101	1.84 <sup>a</sup> ± 1.63	30.6 <sup>a</sup>	18.7 <sup>a</sup>	24.0 <sup>a</sup>	69.7 <sup>a</sup>	60 <sup>a</sup>
	2004	Mar	120	1.72 <sup>a</sup> ± 2.06	30.0 <sup>a</sup>	17.5 <sup>a</sup>	23.1 <sup>a</sup>	67.2 <sup>a</sup>	108 <sup>a</sup>
	2004	Apr	14	1.46 <sup>a</sup> ± 0.74	28.4 <sup>a</sup>	17.6 <sup>a</sup>	22.4 <sup>a</sup>	75.0 <sup>a</sup>	102 <sup>a</sup>
	2004	May	2	0.82 <sup>a</sup> ± 0.13	21.0 <sup>a</sup>	12.3 <sup>a</sup>	16.2 <sup>a</sup>	63.0 <sup>a</sup>	117 <sup>a</sup>
Ortigueira	2003	Feb	7	1.48 <sup>a</sup> ± 1.00	30.1 <sup>a</sup>	18.9 <sup>a</sup>	23.1 <sup>a</sup>	82.3 <sup>a</sup>	195 <sup>a</sup>
	2003	Mar	11	1.41 <sup>a</sup> ± 1.89	29.1 <sup>a</sup>	16.7 <sup>a</sup>	21.6 <sup>a</sup>	78.3 <sup>a</sup>	81 <sup>a</sup>
	2004	Mar	24	1.80 <sup>a</sup> ± 1.47	28.6 <sup>a</sup>	15.2 <sup>a</sup>	20.7 <sup>a</sup>	75.9 <sup>a</sup>	150 <sup>a</sup>
	2004	Apr	7	1.16 <sup>a</sup> ± 0.53	26.6 <sup>a</sup>	16.0 <sup>a</sup>	20.1 <sup>a</sup>	83.3 <sup>a</sup>	117 <sup>a</sup>

\*Means of climatic data (Tmax, Tmin, Tmean, UR) and total rainfall followed by the same letter indicate no significant difference by Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

\*\*Means of total fumonisins followed by the same letter indicate no significant difference by t-test ( $p < 0.05$ ).

n = number of samples.

Total FB = FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>

Tmax = maximum temperature

Tmin = minimum temperature

Tmean = mean temperature

UR = relative humidity

Climatic data from four sites of the North region of Paraná State during the harvesting months (2003 and 2004 crops) as well as mean fumonisin levels (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) are shown in Table 4. Multiple comparison analysis of maximum temperature, minimum temperature, mean temperature, relative humidity and rainfall averages by Tukey's Test indicated no significant difference among the four sites.



Corn samples from Bandeirantes and Cambará (2003 crop) showed higher fumonisin levels (by two-fold) than samples from 2004 crop ( $p < 0.05$ , Table 4). Fumonisin levels showed no significant difference ( $p < 0.05$ ) in samples from Apucarana and Ortigueira regarding to the months and corn crop. Although no significant difference was observed among the mean values of the climatic data, the highest mean fumonisin level ( $3.39 \mu\text{g/g}$ ) was detected in samples collected from Bandeirantes during February (2003 crop), where the highest mean maximum temperature ( $32.2^\circ \text{C}$ ) and rainfall (234 mm) occurred. On the other hand, the lowest mean fumonisin level ( $0.89 \text{mg/g}$ ) was detected in samples collected from Apucarana during May (2004 crop) probably due to lower mean temperature ( $16.2^\circ \text{C}$ ) than the ideal temperature (20 to  $25^\circ \text{C}$ ) for fumonisin production (Marín et al. 1998). High fumonisin levels were produced by *Fusarium* sp. in corn culture at  $25^\circ \text{C}$  and high moisture content in a range of 34 to 42% (Dilkin et al. 2002). Abbas et al. (2006) evaluated 65 corn samples from Arkansas (U.S.A.) and detected higher fumonisin levels during the months with the highest temperatures ( $>31^\circ \text{C}$ ).

In summary, low fumonisin levels were detected in the most of the corn samples used as raw material by processing industries in the North region of Paraná State, probably due to the reduced time interval from reception to drying process. Nevertheless, constant monitoring control throughout the corn producing chain is essential for hazard minimization and compliance with trade requirements.

### **Acknowledgements**

The authors thank the FINEP, CNPq (the Brazilian Government Organization for grant aid and fellowship to Brazilian researchers), the Araucária Foundation, Paraná Fund/SETI and CAPES (Coordination for Formation of High Level Professionals) for the financial support.

They are also grateful to ADETEC (Agency for Technological Development of Londrina city and Region) for project management, especially to Dra. Maria Victoria E. Grossmann and Dr. Plínio Pinto Mendonça Uchoa Jr., as well as to Integrada Cooperativa Agroindustrial, Caramuru Alimentos Ltda. and Kowalski Alimentos Ltda. for providing the corn samples and for the financial support.

## References

- 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**, n 25, p. 1-9.
- Avantaggiato, G., Quaranta, F., Desiderio, E., & Visconti, A. (2002). Fumonisin contamination of maize hybrids visibly damaged by *Sesamia*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.83, p.13-18.
- Brasil, Portaria n. 845 de 8 de novembro de 1976. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília (DF), 30 de novembro de 1976.
- Dilkin, P., Mallmann C.A., Almeida, C.A.A., Stefanon, E.B., Fontana, F.Z., & Milbradt, E.L. (2002). Production of fumonisins by strains of *fusarium moniliforme* according to temperature, moisture and growth period. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 33, p. 111118.
- Lázzari, F.A., & Lázari, S.M.N. (2001). **Silagem de Grão Úmido de Milho**. UFPR/FAPEAGRO/ CNPq/ MCT, 60 p., Curitiba.
- Marasas, W.F.O., Kellerman, T.S., Gelderblom, W.C.A., Coetzer, J.A.W., Thiel, P.G., & Van der Lugt, J.J. (1988). Leukoencephalomalacia in horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.55, p.197-203.
- Marasas, W.F.O., Wiener, N.P.J., Van rensburg, S.J., & Van schalkwyk, D.J. (1981). Mycoflora of corn produced in human esophageal cancer áreas in Transkei, southern Africa. **Phytopathology**, v.71, p.792-796.
- Marín, S., Magan, N., Belli, N., Ramos, A.J., Canela, R., & Sanchis, V. (1999). Two dimensional profiles of fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in relation to environmental factors and potential for modeling toxin formation in maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, v.51, p.159-167.
- Munkvold, G.P., & Desjardins, A.E. (1997). Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, v.81, n.6, p.556-565.
- Nelson, P.E., Tousson, T.A., & Marasas, W.F.O. (1983). ***Fusarium species* - An illustrated manual for identification**. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press.
- Norred, W.P., & Voss, K.A. (1994). Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. **Journal of Food Protection**, Ames, v.57, n.6, p.522-527.

Ono, E.Y.S., Sasaki, E.Y., Hashimoto, E.H., Hara, L.N., Corrêa, B., Itano, E.N., Sugiura, T.; Ueno, Y., & Hirooka, E.Y. (2002). Post-harvest storage of corn: effect of beginning moisture content on mycoflora and fumonisin contamination. **Food Additives and Contaminants.**, v.9, n.11, p.1081-1090.

Oruc, H.H., Cengiz, M., & Kalkanli, O. (2006). Comparasion of aflatoxin and fumonisin levels in maize grown in Turkey and imported from the USA. **Animal Feed Science and Technology.** n. 128, p.337-341.

Ono, E.Y.S., Sugiura, Y., Homechim, M., Kamogae, M., Vizzoni, E., Ueno, Y., & Hirooka, E.Y. (1999). Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, n. 147, p.139-148.

Parana on line. (2007). Arquivo consultado de <http://celepar6.pr.gov.br/municipios/dadosger.asp?codigo=0286600>. Accessed Jan 31.

Ross, P.F., Nelson, P.E., Richard, J.L., Osweiler, G.D., Rice, L.G., Plattner, R.D., & Wilson, T.M. (1990). Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolate associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. **Applied Environmental Microbiology**, v.56, p.3225-3226.

Samson, R.A., Hoeskstra, E.S., Frisvad, J.C., & Filtenborg, O. (1995). **Introduction to food-borne fungi.** The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures (4.ed.).

Shephard, G.S., Sydenham, E.W., Thiel, P.G., & Gelderblom, W.C.A. (1990). Quantitative determination of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **The Journal of Liquid Chromatography**, v.13., p.2077-2087.

Singh, K., Frisvad, J.C., Thrane, U., & Mathur, S.B. (1991). **An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins.** Hellerup/Denmark/: Danish Government.

Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Gelderblom, W.C.A., & Nieuwenhuis, J.J. (1991). Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. **Applied Environmental Microbiology**, v.57: 1089-1093.

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**, v.9, p.27-34.

Ueno, Y., Iijima, K., Wang, S-D., Sugiura, Y., Sekijima, M., Tanaka, T., Chen, C., & Yu, S-Z., (1997). Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: a 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. **Food and Chemical Toxicology**, n.35, 1143-1150.

Van der Westhuizen, L., Shephard, G.S., Scussel, V.M., Costa, L.L.F., Vismer, H.F., Rheeder, J.P., & Marasas, W.F.O. (2003). Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.5574-5578.

Weibking, T., Ledoux, D.R., Bermudez, A.J., Turk, J.R., Rottinghaus, G.E., Wang, E., & Merrill Jr, A.H. (1993). Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B<sub>1</sub>, on the young broiler chick. **Poultry Science**, v. 72, p.456-466.

Yoshizawa, T., Yamashita, A., & Luo, Y. (1994). Fumonisin occurrence in corn from high and low risk areas for human esophageal cancer in China. **Applied Environmental Microbiology**, v.60, n.5, p.1626-1629.

Zang, H., Nagashima, H., & Got, T. (1997). Natural occurrence of mycotoxins in corn samples from high and low risk areas for human esophageal cancer in China. **Mycotoxins**, n.44, p.29-35.

Zinedine, A., Brera, C., Elakhdari, S., Catano, C., Debegnach, F., & Angelini, S. (2006). Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. **Food Control**, n. 17, p.868-874.

Zummo, N., & Scott, G.E. (1992). Interaction of *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus flavus* on kernel infection and aflatoxin contamination in maize ears. **Plant Disease**, n. 76, p.771-773.

## ARTIGO C - COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS CROMATOGRÁFIA EM CAMADA DELGADA (CCD), ESPECTROFLUORIMETRIA E ANÁLISE POR CONTAGEM DE PONTOS DE FLUORESCÊNCIA PARA DETECÇÃO DE AFLATOXINAS EM MILHO.

### Resumo

A técnica de contagem de pontos de fluorescência é utilizada por empresas processadoras de milho para triagem de lotes quanto à presença de aflatoxinas devido à rapidez e praticidade. Face à carência de estudos comprovando a eficiência da técnica de contagem de pontos de fluorescência, este trabalho teve como objetivo comparar esta metodologia com cromatografia em camada delgada e espectrofluorimetria, por meio da análise de 40 amostras de milho naturalmente contaminadas e positivas para *Aspergillus flavus*. De acordo com a contagem de pontos de fluorescência, todas as amostras (n=40) estariam adequadas ao consumo humano e animal, porém a análise por CCD e espectrofluorimetria detectou, respectivamente, 8 e 9 amostras contaminadas com níveis superiores ao limite máximo tolerado (20 mg/kg) para aflatoxinas totais, segundo legislação brasileira. Os resultados obtidos por CCD e espectrofluorimetria apresentaram boa correlação (r=0,97) para análise de milho naturalmente contaminado por aflatoxinas. A técnica de contagem de pontos de fluorescência apresentou 20% de resultados falso-negativos, sugerindo seu emprego como triagem para seleção de lotes com possível contaminação para serem analisados posteriormente por técnicas mais sensíveis e precisas.

**Palavras-chave:** Cromatografia em Camada Delgada. Contagem de Pontos de Fluorescência. Espectrofluorimetria. Aflatoxinas.

### Introdução

Aflatoxinas são metabólitos secundários tóxicos, produzidos principalmente por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (MOSS, 1991; FARIAS *et al.*, 2000). As aflatoxinas B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) e G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) são encontradas em milho (HUSSEIN; BRASEL, 2001), no entanto a AFB<sub>1</sub> é a mais freqüente, e a mais tóxica, oferecendo riscos à saúde humana devido ao seu potencial efeito carcinogênico, mutagênico e teratogênico (WHO, 1979).

A comercialização da safra depende muito da qualidade dos grãos, fator determinante em termos de mercado internacional, uma vez que barreiras fitossanitárias foram estabelecidas por países importadores, exigindo alta qualidade e contaminação mínima com relação a fungos e micotoxinas. O monitoramento

constante é a única forma viável para garantir o fornecimento de produtos aceitáveis ao mercado externo. Organizações Comerciais como a União Européia diminuíram limites de tolerância para aflatoxinas, estabelecendo limites máximos de 2 ug/kg para AFB<sub>1</sub> e 4 ug/kg para aflatoxina total em grãos (SABINO, 2001). Medidas restritivas acarretam fortes implicações comerciais, pois limitam o volume de exportações, reduzem o preço do "commoditie", além de aumentar custos com amostragem, análise e controle (SABINO, 1989). Os limites regulatórios cada vez mais rigorosos aumentaram a necessidade de metodologias rápidas, práticas e confiáveis.

Métodos analíticos para detecção de aflatoxinas em milho e derivados incluem cromatografia em camada delgada (CCD) (STROKA e ANKLAM, 2000), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (TRUCKSESS, 1994) e cromatografia gasosa-associada a espectrometria de massa (CG-MS) (PESTKA *et al.*, 1994). Embora sejam métodos precisos e reprodutíveis, apresentam limitações como necessidade de pré-limpeza extensiva da amostra, custo elevado, e exigência de pessoal técnico qualificado, inviabilizando a realização de testes em grande volume de grãos, a exemplo do que acontece com empresas processadoras de milho.

O teste por verificação de pontos de fluorescência é prático e proporciona resultados rápidos, sendo realizado em amostras de milho, previamente triturado e submetido à luz ultravioleta. A detecção de três ou mais pontos fluorescentes, classifica o lote amostrado como inadequado para o consumo humano e animal. Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do método de contagem de pontos fluorescentes em amostras de milho e comparar os resultados com métodos físico-químicos de análise de aflatoxinas, cromatografia em camada delgada (CCD) e espectrofluorimetria.

## Material e Métodos

### *Amostras de Milho*

Dentre 1070 amostras de milho recém-colhido, provenientes de empresas processadoras de milho da Região Norte do Estado do Paraná, foram selecionadas 40 amostras positivas para *Aspergillus do grupo flavus*, após contagem de bolores e leveduras. As amostras foram coletadas de 9 a 12 pontos da carga do caminhão da cooperativa logo após a colheita, sendo que em cada calada, foram retirados 650g de milho até total de 10 kg. A seguir as amostras foram homogeneizadas, sendo retirados 1,0 kg para ser submetido à classificação segundo um protocolo-guia brasileiro, referente à Portaria n. 845 de 8 de novembro de 1976 (Brasil, 1976). Cerca de 1,0 kg de amostra foi enviada ao laboratório e conservado a 4°C num período máximo de 7 dias para análise microbiológica. As amostras para análise de aflatoxinas foram trituradas (granulometria de 50 "mesh") e individualmente conservadas a -20 °C até serem analisadas.

### *Determinação de Pontos de Fluorescência*

As amostras foram analisadas quanto à presença de pontos de fluorescência na unidade processadora de milho, segundo metodologia de Contagem de Fluorescência. Uma alíquota de 0,1 kg da amostra foi triturada e submetida à fonte de luz ultravioleta ( $\lambda$  de 265 nm). Pelo visor foram contados pontos que apresentavam fluorescência, sendo que o resultado acima de 2 pontos classificava o lote como inadequado ao consumo humano e animal.

### *Extração de Aflatoxinas*

A extração de aflatoxinas foi realizada segundo o método descrito por Soares e Rodriguez-Amaya (1989). Uma alíquota de 50g da amostra, previamente triturada, foi acrescida de 270 mL de metanol e 30 mL de KCl a 4%, seguida de homogeneização em liquidificador por 5 minutos e filtração em papel de filtro Whatman n°. 4. Uma alíquota de 150 mL foi retirada e adicionada de 150 mL de sulfato de amônia a 30% e cerca de 20g de terra de diatomácea. Após homogeneização, o material foi filtrado com papel de filtro Watman n°. 4. Cerca de 150 mL do filtrado mais 150 mL de água deionizada e 10 mL de clorofórmio foram

submetidos ao processo de partição em funil de separação. O conteúdo do funil de separação foi agitado por 3 minutos e após 10 minutos de decantação, foram coletados 5 mL, adicionados mais 10 mL de clorofórmio à solução do funil de separação e agitados por mais 3 minutos, decantados por 10 minutos e coletados mais 5 mL. As duas frações de clorofórmio foram reunidas e evaporadas em banho-maria a 50 °C. As amostras foram estocadas a -20 °C até serem analisadas.

#### *Cromatografia em Camada Delgada*

As aflatoxinas foram identificadas e quantificadas em placas de sílicagel 60G Merk, utilizando como fase móvel tolueno: acetato de etila: clorofórmio: ácido fórmico, (70:50:50:20, v/v/v/v), segundo a metodologia descrita por Gimeno (1979). Os valores de recuperação foram de 97% para AFB<sub>1</sub>, 93% para AFG<sub>1</sub>, 93% para AFB<sub>2</sub> e 94% para AFG<sub>2</sub> em milho artificialmente contaminado em níveis de 5, 10 e 20 mg/kg (em duplicata), com coeficiente de variação de 11%. O limite de detecção foi de 3 µg/kg.

#### *Espectrofluorimetria*

A uma alíquota de 50g da amostra previamente triturada (granulometria de 50 "mesh") foram adicionados 5g de NaCl e 100 mL de solução de metanol : água (80:20, v/v). Após agitação e filtração em papel de filtro, um volume de 10 mL do extrato filtrado foi diluído com 40 mL de água ultra-pura e cerca de 5 mL foram submetidos à pré-limpeza utilizando coluna de imunoafinidade -Aflatest-P®, com fluxo intermitente de 1 a 2 gotas por segundo. Em seguida, 10 mL de água ultra-pura foram passadas pela coluna sob mesmo fluxo. Para eluição da aflatoxina, foi utilizado 1 mL de metanol grau HPLC. A quantificação foi realizada com adição de 1 mL de revelador (solução aquosa de bromo a 0,005%, v/v), sendo a leitura realizada dentro de 60 segundos. Os comprimentos de onda utilizados foram de 363 nm para excitação e 440 nm para emissão. O limite de detecção foi de 1

#### *Análise Estatística*

A correlação entre cromatografia em camada delgada e espectrofluorimetria foi realizada pelo teste de correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ). A análise estatística foi realizada pelo software Statistic 6.0 (Stat Soft, Inc.).



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 está sumarizada a contagem de *Aspergillus* do grupo *flavus*, número de pontos de fluorescência e níveis de aflatoxinas totais determinados por CCD e espectrofluorimetria em 40 amostras de milho recém-colhido da Região Norte do Paraná. As amostras selecionadas para a comparação de diferentes metodologias foram todas positivas para contagem de *Aspergillus* do grupo *flavus*, com variação de  $1,0 \times 10^2$  a  $1,0 \times 10^4$  UFC/g de milho. Um total de 33 amostras (82,5%) apresentaram um ponto de fluorescência, 2 amostras (5%) dois pontos de fluorescência e 5 amostras (12,5%) não apresentaram ponto de fluorescência. De acordo com o critério de avaliação das empresas processadoras de milho, todas as amostras estariam adequadas ao consumo humano. Esses resultados não estão de acordo com a análise por CCD e espectrofluorimetria que detectou 8 e 9 amostras, respectivamente, acima do limite máximo tolerado ( $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), caracterizando resultados falso-negativos. Glória *et al.* (1998) detectaram 14 resultados falso-negativos em 286 amostras de milho analisadas por contagem de fluorescência luminosa amarelo-esverdeada (CFLAE), que estavam contaminadas com níveis superiores a  $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ , quando as mesmas foram analisadas por CCD. Palomino *et al.* (1998) ao analisarem 61 amostras de milho pela técnica CFLAE, detectaram 2 amostras (3%) falso-negativas, em comparação à análise por CCD.

**Tabela 1.** Contagem de *Aspergillus* do grupo *flavus*, contagem de pontos de fluorescência e níveis de aflatoxinas totais determinados por CCD e espectrofluorimetria em 40 amostras de milho recém colhido da Região Norte do Paraná.

Amostras	Aflatoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		<i>Aspergillus</i> grupo <i>flavus</i> (UFC/g)	Pontos de fluorescência
	CCD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Espectrofluorimetria ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		
1	3,00	5,64	$1,0 \times 10^2$	1
2	32,00	41,12	$1,0 \times 10^2$	1
3	4,50	10,23	$1,0 \times 10^2$	1
4	4,00	12,75	$1,5 \times 10^2$	1
5	ND	ND	$3,0 \times 10^3$	2
6	ND	ND	$1,0 \times 10^2$	1
7	ND	2,16	$1,0 \times 10^2$	1
8	5,50	9,97	$1,0 \times 10^4$	1
9	ND	ND	$1,0 \times 10^2$	ND
10	10,50	16,18	$5,5 \times 10^3$	1
11	ND	1,72	$2,0 \times 10^2$	ND
12	ND	1,44	$1,0 \times 10^2$	1
13	ND	1,22	$1,0 \times 10^2$	1
14	54,00	58,66	$1,0 \times 10^4$	1
15	ND	ND	$1,0 \times 10^2$	1
16	ND	ND	$1,5 \times 10^2$	ND
17	ND	1,00	$1,0 \times 10^2$	ND
18	27,00	34,70	$1,0 \times 10^2$	1
19	ND	1,50	$1,0 \times 10^2$	ND
20	5,00	9,26	$1,0 \times 10^3$	1
21	ND	1,30	$1,5 \times 10^3$	1
22	38,00	42,55	$1,0 \times 10^3$	1
23	ND	ND	$1,0 \times 10^3$	1
24	ND	ND	$5,0 \times 10^2$	1
25	20,00	25,29	$1,0 \times 10^3$	1
26	ND	ND	$5,0 \times 10^2$	1
27	ND	1,15	$1,0 \times 10^3$	1
28	45,00	49,67	$1,0 \times 10^4$	1
29	ND	ND	$1,0 \times 10^3$	1
30	ND	1,38	$1,0 \times 10^2$	1
31	ND	ND	$1,0 \times 10^2$	1
32	ND	ND	$5,0 \times 10^2$	1
33	10,00	14,01	$1,0 \times 10^2$	1
34	ND	ND	$1,0 \times 10^2$	1
35	ND	ND	$1,0 \times 10^2$	1
36	10,00	15,39	$5,0 \times 10^3$	1
37	25,00	30,23	$1,0 \times 10^4$	2
38	25,00	39,87	$4,5 \times 10^3$	1
39	ND	ND	$1,0 \times 10^3$	1
40	ND	ND	$4,0 \times 10^2$	1

ND = não detectado

Dentre as 40 amostras de milho analisadas, 5 amostras (12,5%) não apresentaram pontos de fluorescência sob luz ultravioleta, embora estivessem contaminadas tanto por *A. flavus* quanto por aflatoxinas (Tabela 1), mostrando que o método por contagem de pontos de fluorescência não é específico para detecção de aflatoxinas em milho, uma vez que interferentes presentes na matriz do milho, quando excitados pela luz ultravioleta, podem absorver e emitir luz fluorescente com comprimentos de onda semelhantes ao das aflatoxinas (MÜHLEMANN *et al.*, 1997) ocasionando resultados falso-positivos. Além disso, a micotoxina pode ocupar a região mais interna do grão, impedindo a detecção por esta metodologia, em grãos íntegros (SHOTWELL *et al.*, 1974), o que causaria resultados falso-negativos. Shotwell e Hesseltine (1981) recomendam a trituração da amostra como proposta para evitar resultados falso-negativos.

A análise dos níveis de aflatoxinas totais indicou que valores obtidos por espectrofluorimetria foram superiores àqueles detectados por CCD (Tabela 1). As aflatoxinas foram detectadas por CCD em 16 (40%) amostras de milho, com variação de 3,00 a 54,00 µg/kg (média de  $7,96 \pm 14,01$  µg/kg), enquanto que por espectrofluorimetria em 24 (60%) amostras, com teores que variaram de 1,15 a 58,66 µg/kg (média de  $10,68 \pm 16,32$  µg/kg). Os níveis de aflatoxinas variando de 1,0 a 10 µg/kg foram detectados em 7 (17,5%) amostras por CCD e 12 (30%) amostras por espectrofluorimetria, enquanto que níveis variando de 10,1 a 60,0 µg/kg foram detectados em 9 (22,5%) amostras por CCD e 13 (32,5%) por espectrofluorimetria. Considerado 20 µg/kg o limite máximo permitido pela legislação brasileira para aflatoxinas totais ( $AFB_1 + AFB_2 + AFG_1 + AFG_2$ ), 33 (82,5%) amostras por CCD e 32 (80%) por espectrofluorimetria, estariam adequadas ao consumo (Brasil, 1996).

**Tabela 2.** Razão Espectrofluorimetria/CCD em 40 amostras de milho.

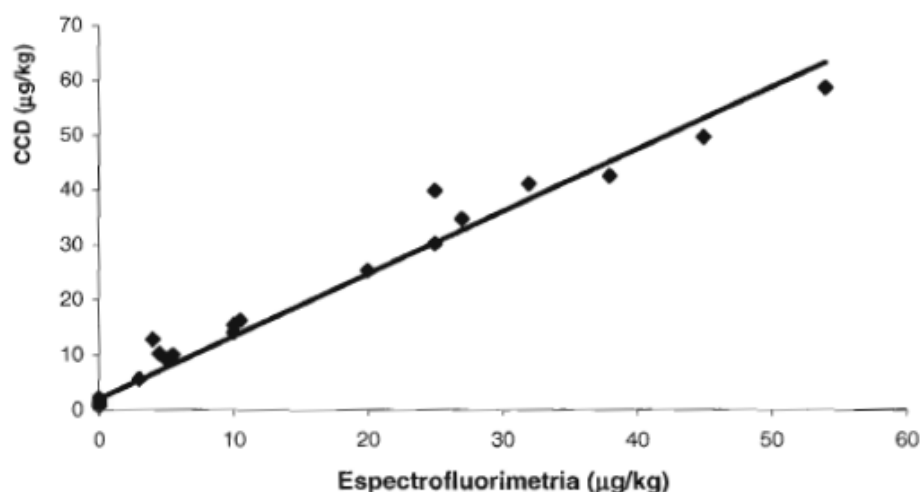
<b>ESPECTROFLUORIMETRIA/CCD</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>nd/nd</b>	15	37,5
<b>d/nd</b>	9	22,5
<b>1,00 – 1,50</b>	8	20,0
<b>1,51 – 3,00</b>	7	17,5
<b>3,01 – 4,00</b>	1	2,5

N = n°. de amostras.

nd = não detectado.

d = detectado.

Na Tabela 2 estão apresentados os valores para razão espectrofluorimetria/CCD em 40 amostras de milho, sendo que em 15 amostras (37,5%) não foram detectadas aflatoxinas por ambas metodologias. Em 9 amostras (22,5%), as aflatoxinas foram detectadas por espectrofluorimetria, porém não por CCD, provavelmente devido ao baixo limite de detecção por espectrofluorimetria (1,0 µg/kg) comparado com CCD (3,0 µg/kg). Os níveis de aflatoxinas detectados por espectrofluorimetria foram de 1,1 a 1,5 vezes mais elevados que CCD em 8 (20%) das amostras (Tabela 2), provavelmente devido à maior eficiência na extração e pré-limpeza pela utilização de colunas de imunoafinidade (NILÜFER E BOYACIOGLU, 2002), além da inespecificidade de anticorpos da coluna de imunoafinidade, que poderiam extrair metabólitos intermediários estruturalmente semelhantes às aflatoxinas, superestimando os valores (TRUCKSESS & KOELTZOW, 1995).



**Figura 1.** Correlação dos dados entre CCD e espectrofluorimetria para detecção de aflatoxinas em amostras de milho naturalmente contaminado (n=40). A equação de regressão linear  $Y = 1,1357 X + 1,9671$  foi obtida com coeficiente de correlação de 0,97. X e Y representam a concentração de aflatoxinas (µg/kg) determinada independentemente por CCD e espectrofluorimetria.

A correlação entre os dados de amostras positivas para aflatoxinas, detectadas por CCD e espectrofluorimetria está apresentada na Figura 1. O coeficiente de correlação de 0,97 calculado pela equação  $Y = 1,1357 X + 1,9671$ , foi similar à correlação obtida por Nilüfer e Boyacioglu (2002), que encontraram uma correlação de 0,98 entre CLAE e espectrofluorimetria ao avaliarem a concentração de aflatoxinas em 14 amostras de pasta de gergelim na Turquia. Pestka *et al.* (1994) analisando aflatoxinas em 20 amostras de alimentos a base de cereais, observaram correlação de 0,94 entre cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (GC-MS). Os resultados (Figura 1) indicam boa correlação entre CCD e espectrofluorimetria para análise de aflatoxinas em milho naturalmente contaminado. A técnica por contagem de fluorescência apresentou 20% de resultados falso-negativos, sugerindo o seu uso apenas como forma de triagem, para seleção de lotes com possível contaminação para serem analisadas posteriormente por técnicas mais sensíveis.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FINEP, CNPq, Fundo Paraná/SETI, Fundação Araucária e CAPES pelo apoio financeiro. Os autores também agradecem às cooperativas pelo fornecimento de amostras de milho e à ADETEC (Agência de

Desenvolvimento Tecnológico da Cidade de Londrina e Região) pelo apoio e gerenciamento administrativo do projeto.

## Referências

BRASIL. Portaria n.845, de 8 de novembro de 1976. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 30 de novembro de 1976.

FARIAS, A. X. et al. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. Em milho pós-colheita no estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 35, p. 617-621, 2000.

GIMENO, A. Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin and penitrem. **Journal of the Association of Analytical Chemistry**, v. 62, p. 579-585, 1979.

GLORIA, E. M.; FONSECA, H.; SOUZA, I. M. Occurrence of mycotoxins in maize delivered to the food industry in Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 15, n. 2, p. 181-184, 1998.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Review: toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.

MOSS, M. O. Economic importance of mycotoxins - recent incidence in the United States. **Animal Science**, v. 27, p. 3941-3949, 1991.

MÜHLEMANN, M.; LÜTHY, J.; HÜBNER, P. Mycotoxin contamination of food in Ecuador A -Atoxins. **Mitt Geb Lebensmittelunters Hyg**, n. 88, p. 474-496, 1999.

NILÜFER, D.; BOYACIOGLU, D. Comparative study of three different methods for the determination of aflatoxins in tahini. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3375-3379, 2002.

PALOMINO, M. E. T. et al. Avaliação do método de triagem para análise de milho amarelo-esverdeado brilhante (BGYF - Bright Greenish Yellow Fluorescence). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, 2007.

PESTKA, J. J.; AZCONA-OLIVEIRA, J. I.; PLATTNER, R. D.; MINERVINI, F.; DOKO, M. B.; VISCONTI, A. Comparative assessment of fumonisin in grain-based foods by ELISA, GC-MS and HPLC. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 169-172, 1994.

SABINO, M. **Normas e níveis de tolerância de micotoxinas no Brasil, no MERCOSUL e no mundo**. In: SIMPÓSIO SOBRE MICOTOXINAS EM GRÃO, 1999, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Fundação Cargil, 2001. p.183-192.

\_\_\_\_\_. Prevenção e controle de micotoxinas. In: ENCONTRO NACIONAL DE

ANALISTAS DE ALIMENTOS, 4., 1989, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 1989. p. 239-244.

SHOOTWELL, O. L.; HESSELTINE, C. W. Use of bright greenish yellow fluorescence as presumptive test for aflatoxin in corn. **Cereal Chemistry**, v. 58, n. 2, p.124-127, 1981.

SHOOTWELL, O. L.; GOULDEN, M. L.; HESSELTINE, C. W. Aflatoxin: distribution in contaminated corn. **Cereal Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 492-499, 1974.

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

STROKA, J., et al. *Irmnuno*-affinity column clean-up with liquid chromatography post column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste and paprika powder: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, n. 83, p. 320-340, 2000.

TRUCKESS, M. W.; STACK, M. E.; NESHEIM, S.; ALBERT, R. H.; HOMER, T. R. Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in corn, almonds, brazil nuts, peanuts and pistachio nuts: Collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v. 77, p. 1512-1521, 1994.

WHO (World Health Organization). Mycotoxins. Geneva: UNEP/WHO, 1979, p.127.

## 6 CONCLUSÕES

Os níveis de fumonisinas e o intervalo de tempo entre colheita e pré-secagem apresentaram correlação positiva (00,96) ( $p < 0,05$ ), sugerindo que o retardo da secagem contribui para o aumento na contaminação por fumonisinas em milho

Níveis baixos de fumonisinas foram detectados em amostras de milho utilizadas como matéria-prima pelas empresas processadoras da Região Norte do Estado do Paraná, ratificando que o constante monitoramento é essencial para produzir milho com qualidade fitossanitária adequada às recomendações comerciais.

As metodologias baseadas em princípios físico-químicos (CCD e espectrofluorimetria) para análise de milho naturalmente contaminado por aflatoxinas apresentaram boa correlação, enquanto que o método por contagem de pontos de fluorescência apresentou 20% de resultados falso-negativos, demonstrando ser pouco sensível em relação à CCD e espectrofluorimetria. Os resultados sugerem o emprego de análise de aflatoxinas por pontos de fluorescência apenas como triagem para selecionar possíveis lotes contaminados.



## REFERÊNCIAS

- ABADO-BECOGNEE, K. *et al.* Citotoxicity of fumonisin B<sub>1</sub>: implication of lipid peroxidation and inhibition of protein and DNA synthesis. **Archives of Toxicology**, New York, v. 72, p. 223-236, 1998.
- ABBAS, H. K. *et al.* Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. **Crop Protection**, n. 25, p. 1-9, 2006.
- ABBAS, H. T.; OCAMB, C. M. First report of fumonisin B<sub>1</sub> *Fusarium polyphialidicum* collected from seeds of *Pinus strobes*. **Plant Disease**, v. 79, p. 642-645, 1995.
- ABIMILHO - Associação Brasileira das Indústrias de Milho, 2006. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br>>. Acesso em: 20 jan. 2006.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. New York: Academic Press, 1998.
- AH SEO, J.; WON LEE, Y. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, p.1331-1334, 1999.
- ALBERTS, J. F.; GELDERBLUM, W. C. A.; THIEL, P. G. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B<sub>1</sub> by *Fusarium moniliforme*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1729-1733, 1990.
- AL-DOORY, Y.; WAGNER, G. E. **Aspergilosis**. Illinois: C. C. Thomas, 1985. p. 256.
- ALMEIDA, A. P. *et al.* Mycoflora and fumonisin contamination in brazilian corn from sowing to harvest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3375-3882, 2002.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Legislação**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 15 dez. 2001.
- AVANTAGGIATO, G. *et al.* Fumonisin contamination of maize hybrids visibly damaged by *Sesamia*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 13-18, 2002.
- BAKAN, B. *et al.* Fungal growth and *Fusarium* mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetically modified maize grown in France and Spain., **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 728-731, 2002.
- BEZUIDENHOUT, S. C.; GELDERBLUM, W. C. A.; GORST-ALLMAN, C. P. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal Chemical Society Chemistry Communications**, p. 743-745, 1988.

BITTENCOURT, A. B. F. *et al.*. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. **Food Control**, v. 6, p. 117-120, 2005.

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

BLUM, M. M. C.; FONTOURA, S. M. V.; NOVATIZKI, M. R.; CLAZER, E. R. Efeito de doses de nitrogênio e populações sobre a incidência de fungos na semente de milho colhida. *In*: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 5., 1998, Ponta Grossa - PR. **Sanidade de sementes no Séc. XXI**: Programa e Resumos. Ponta Grossa – PR, 1998. p. 27.

BRASIL. Portaria MAARA n. 183, de 21 de março de 1996. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 mar. 1996. Seção I, p. 4929.

\_\_\_\_\_. Portaria n. 845, de 8 de novembro de 1976. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 30 nov. 1976.

CARVALHO, F. C.; FERREIRA, C. R. R. P. T.; TSUNECHIRO, A. Avaliação econômica das perdas pós-colheita de milho no Brasil. *In*: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 18., 1990, Vitória. **Anais...** Vitória: EMCAPA, 1990. p. 8-13.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Fungos associados à semente de milho produzidas nas regiões sul e sudeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p. 370-373, 1998.

CASTELLÁ, G.; BRAGULAT, M. R.; CABANES, F. J. Surveillance of fumonisins in maize-based feeds and cereals from Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4707-4710, 1999.

CHAMBERLAIN, W. J.; BACON, C. W.; NORRED, W. P. Levels of fumonisin B<sub>1</sub> in corn naturally contaminated with aflatoxins. **Food and Chemical Toxicology**, v. 31, n. 12, p. 995-998, 1993.

CHRISTENSEN, C. N.; SAUER, D. B. Mycoflora: *In*: CHRISTENSEN, C. N. (Ed.). **Storage of cereal grains and their products**. Minnesota: American Association of Cereal Chemists, 1982. p. 219-240.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Milho**: análise perspectiva do mercado-safra 2006/2007. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 20 jan. 2007.

COTTY, P. J.; BHATNAGAR, D. Variability among atoxigenic *Aspergillus flavus* strains in ability to prevent aflatoxin contamination and production of aflatoxin biosynthetic pathway enzymes. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2248-2251, 1994.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe: review article. **Toxicology Letters**, v. 127, p. 19-28, 2002.

DEL RIO, L.; ZÚNGIA, T. Efecto de algunas practicas culturales y fechas de recoleccion em la incidência de *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sutton em maiz sembrado en dos sistemas de labranza. **Ceiba**, v. 32, p. 141-149, 1991.

DENTI, A. E.; REIS, E. M. Efeito da rotação de culturas, da monocultura e da densidade de plantas na incidência das podridões da base do colmo e no rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, n. 26, p. 635-639, 2001.

DESJARDINS, A. E. et al. Genetic analysis of fumonisin production and virulence of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*) on maize (*Zea mays*) seedlings. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 79-86, 1995.

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

DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D.; PROCTOR, R. H. Linkage among genes responsible for fumomisin biosynthesis in *Gibberella Fujikuroi* mating Population A. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2571-2576, 1996.

DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D.; NELSON, P. E. Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* strains from maize in Northeast Mexico. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1695-1697, 1994.

DIAZ, G. J.; BOERMANS, H. J. Fumonisin toxicosis in domestic animals: a review. **Veterinary Human of Toxicology**, v. 36, n. 6, p. 548-555, 1994.

DILKIN, P. et al. Production offumonisins by strains offusarium moniliforme according to temperature, moisture and growth period. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 111-118, 2002.

DILKIN, P. Micotoxicose suína: aspectos preventivos, clínicos e patológicos. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 187-191, 2002b.

DILKIN, P.; MALLMANN, C. A.; SANTURIO, J. M. Classificação macroscópica, identificação de microbiota fúngica e produção de aflatoxinas em híbridos de milho. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 137-141, 2000.

DUPUY, J. et al. Thermostability of fumonisin B<sub>1</sub>, a mycotoxin from *Fusarium moniliforme*, in corn. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 2864-2867, 1993.

EICHELBERGER, L. **Secagem e armazenamento de grãos**: manual de treinamento. Porto Alegre: Senar - RS, 2000. 72 p.

ERDINGTON, T. S. et al. Acute hepatic and renal toxicity in lambs dosed with fumonisin-containing culture material. **Journal of the Animal Science**, v. 73, p. 508-515, 1995.

EZZAT, M. F. A. Occurrence and toxigenicity of *Fusarium moniliforme* from freshly harvested maize ears with special references to fumonisin production in Egypt. **Mycopathologia**, v. 140, p. 99-103, 1998.

FANCELLI, A. L. Tecnologia da produção. In: **Milho**: produção, pré-processamento e transformação industrial. São Paulo: Secretaria da Indústria e Comércio, Ciência e Tecnologia, 1983. p.1-68.

FANDOHAN, P.; GNONLONFIN, B.; HELL, K.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, M. J. Natural occurrence of *Fusarium* and subsequent fumonisin contamination in preharvest and stored maize in Benin, West Africa. **Intern. Journal Food of Microbiology**, v.99, n. 2, p. 183-183, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Manual sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) em la prevención y control de las micotoxinas**. Roma, 2003. 130 p.

FAO/WHO. **Application of risk analysis to food standard issues**: report of the Joint FAO/WHO expert consultation. Geneva: WHO, 1995.

FINCHAM, J. E. et al. Atherogenic effects in a nonhuman primate of *Fusarium moniliforme* cultures added to a carbohydrate diet. **Atherosclerosis**, v. 94, p. 13-25, 1992.

FOLEY, D. C. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, v. 52, p. 870-872, 1962.

FONSECA, H. Fatores que influem na ocorrência de micotoxinas em milho. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE MILHO SAFRINHA, 6.; CONFERÊNCIA NACIONAL DE PÓS-COLHEITA, 2., 2001, Londrina. **Resumos e Palestras**. Londrina, 2001. p. 161-171.

\_\_\_\_\_. O amendoim e a aflatoxina. **Boletim Técnico**. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br>>. Acesso em: 13 mar. 2003.

FONSECA, H.; CALORI-DOMINGUES, M. A.; GLORIA, E. M.; ZEMBELLO, I. V.; SEGATTI-PIEIDADE. Ocorrência de amendoim contaminado no Estado de São Paulo nos anos de 1990-1996. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 9., 1998, Florianópolis. Anais... Florianópolis: UFSC, 1998. p. 118.

FONSECA, M. J. O. Secagem e armazenamento no milho. **Boletim Técnico da Embrapa Milho e Sorgo**. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acesso em: 20 nov. 2005.

GELDERBLOM, W. C. A.; SAMPLE, E.; MARASAS, W. F. O. The cancer initiating potential of the fumonisins B mycotoxins. **Carcinogenesis**, n. 13, p. 433-437, 1992.

GELDERBLOM, W. C. A. et al. Câncer initiation by fumonisin Bi in rat liver - role of cell proliferation. **Cancer Letters**, v. 169, p. 127-137, 2001.

GELDERBLOM, W. C. A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W. F. O. Fumonisins - novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1806-1811, 1988.

GERAGE, A. C.; SAMAHA, M. J.; BITTENCOURT, C. R. Milho. **Boletim Embrapa**. Disponível em: <<http://www.embrapa.org.br>>. Acesso em: 18 set. 2004.

GONCALVEZ, E.; PINTO, M. M.; FELÍCIO, J. D. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. **Biológico**, v. 63, n. 1, p. 15-19, 2001.

GUTLEB, A. C.; MORRISON, E.; MURK, A. J. Citotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 11, p. 309-320, 2002.

HALIBURTON, J. C.; VESONDER, R. F.; LOCK, T. F.; BUCK, W. B. Equine leucoencephalomalacia (ELEM): a study of *Fusarium moniliforme* as an etiological agent. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 21, p. 348-351, 1979.

HARRISON, L. R.; COLVIN, B. M.; GREENE, J. T.; NEWMAN, L. E.; COLE, J. R. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B<sub>1</sub>, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 2, p. 217-221, 1990.

HASCHEK, W. M.; GUMPRECHT, L. A.; SMITH, G. et al. Fumonisin toxicosis in swine: an overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. **Environm. Health Perspect**, v. 109, p. 251-257, 2001.

HERRERA, T.; ULLOA, M. **El reino de los hongos**: micología básica y aplicada. México: Universidad Nacional Autónoma del México, 1990.

HILL, R. A.; WILSON, D. M.; McMILLIAN, W. W.; COLE, R. J.; SANDERS, T. H.; BLANKENSHIP, P. D. Ecology of the *Aspergillus flavus* group and aflatoxin formation in Maize and groundnut. In: LACEY, J. (ed.). **Trichothecenes and other mycotoxins**. Chichester: John Wiley Sons, 1985. p. 79-95.

HIROOKA, E. Y.; VIOTTI, N. M. A.; MAROCHI, M. A.; ISHII, K.; UENO, Y. Leucoencefalomalácia em eqüinos do Norte do Paraná. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 21, p. 223-227, 1990.

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

HOWERTH, E. W.; WYATT, R. D. ; HAYES, D. A. Equine leucoencephalomalacia in white tailed deer from North Carolina. **J. Wildl. Dis.**, v. 25, p. 384-387, 1989.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Review: toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.

JECFA. **Summary of evaluations performed by the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) 1956-1995, first through forty-fourth meetings**. Geneva: FAO/WHO; ILSI Press, 1996.

JINDAL, N.; MAHIPAL, S. K.; ROTTINGHAUS, G. E. Occurrence of fumonisin B<sub>1</sub> in maize and poultry feeds in Haryana, India. **Mycopathologia**, v. 148, p. 37-40, 1999.

JONES, R. K.; DUNCAN, H. E.; HAMILTON, P. B. Planting date, harvest date, and irrigation effects on infection and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in field corn. **Phytopathology**, v. 71, n. 8, p. 810-816, 1981.

JULIAN, A. M. et al.. Fungal contamination and selected mycotoxins in pre and postharvest maize in Honduras. **Mycopathologia**, v. 129, p. 5-16, 1995.

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

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

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

LÁZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2. ed. Curitiba: Edição do autor, 1997.

\_\_\_\_\_. Controle de micotoxinas no armazenamento de grãos e subprodutos. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE MILHO SAFRINHA, 6.; CONFERÊNCIA NACIONAL DE PÓS-COLHEITA, 2., 2001. Londrina. **Resumos e Palestras**. Londrina, 2001. p. 161-171.

LÁZZARI, F. A.; LAZARRI, S. M. N. **Silagem de grão úmido de milho**. Curitiba: UFPR/FAPEAGRO/ CNPq/ MCT, 2001.

LEDOUX, D. R. et al. *Fusarium* toxicity in broiler chicks. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 4, p. 330-333, 1992.

LONDERO, A. T.; CORTÊS, J. M. G. Aspergiloses pulmonares. **J. Pneumologia**, v. 16, n. 2, p. 78-90, 1990.

LUMLERTDACHA, S.; LOVELL, R. T.; SHELBY, R. A.; LENZ, S. D.; KEMPPAINEN, B. W. Growth, hematology and histopathology of channel catfish, *Lichalurus punctatus*, fed toxins from *Fusarium moniliforme*. **Aquaculture**, v. 130, p. 201-218, 1995.

MACHADO, J. C. Padrão de tolerância de patógenos associados à sementes. In: LUZ, W. C.; FERNANDES, J. M. C.; PRESTES, A. M.; PICININI, D. C. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 1994. v.4, p.229-263.

MALLMANN, C. A.; et al. Fumonisin B<sub>1</sub> levels in cereals and feeds from southern Brazil. **Arq. Inst. Biol.**, v. 68, n. 1, p. 41-45, 2001.

MANTOVANI, E. C. **Colheita mecânica, secagem e armazenamento do milho**. São Paulo: Fundação Cargill, 1989. Cap. 1, p. 1-24.

MARASAS, W. F. O. Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. **Environ Health Perspect**, v. 109, n. 2, p. 239-243, 2001.

MARASAS, W. F. O. et al. Leukoencephalomalacia in horse induced by fumonisin B<sub>1</sub> isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 197-203, 1988.

MARASAS, W. F. O. et al. Mycoflora of corn produced in human esophageal cancer areas in Transkei, southern Africa. **Phytopathology**, v. 71, p. 792-796, 1981.

MARÍN, S. et al. Impact of *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* colonization of maize on calorific losses and fumonisin production under different environmental conditions. **Journal of Stored Products Research**, v. 35, p. 15-26, 1999.

MARÍN, S. et al. Two dimensional profiles of fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in relation to environmental factors and potential for modeling toxin formation in maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 51, p. 159-167, 1999.

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 Microbiology**, v. 41, p. 1063-1070, 1995.

MENEGAZZO, R.; GIACOMINI, V.; TRICHEZ, M. A.; LÁZZARI, F. A. Amostragem e monitoramento de micotoxinas em matérias primas para rações. *In: SEMINÁRIO NACIONAL DE MILHO SAFRINHA, 6., CONFERÊNCIA NACIONAL DE PÓS-COLHEITA, 2., 2001, Londrina. Resumos e Palestras.* Londrina, 2001. p. 161-171.

MILLER J. D. Global significance of mycotoxins and phycotoxins. *In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 9., Rome: Instituto Superiore di Sanità, 1996.*

MILLER, J. D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research**, v. 31, p. 1-6, 1995.

MISSMER, S. A. et al. Exposure to corn-based foods and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border. **Epidemiology**, 2004.

MORAES, R. J. Q. et al. Dosagem de ergosterol como indicadores de contaminação fúngica em milho armazenado. **Arq. Inst. Biol.**, v. 70, n. 4, p. 483-489, 2003.

MORICOCCHI, L. et al. Potencial de produção e produtividade da agricultura paulista. **Agricultura**, São Paulo, v. 36, p. 127-148, 1989.

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

NELSON, P. E. et al. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 2410-2412, 1991.

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

NELSON, P. E.; TOUSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. **Fusarium species: an illustrated manual for identification.** London.: The Pennsylvania State University Press, 1983.

NILÜFER, D.; BOYACIOGLU, D. Comparative study of three different methods for the determination of aflatoxins in hazelnut. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3375-3379, 2002.

NORDIN, N.; LUCHESE, R. H. Detecção de Aflatoxina e zearalenona em milho (*Zea mays*), destinado à alimentação humana. **Bol. SBCTA**, v. 32, n. 1, p. 35-39, 1998.

NORRED, W. P. Agriculturally important fungal toxins. **Chemical Health and Safety**. p. 22-25, Jul-Agu, 2000.



NORRED, W. P.; VOSS, K. A. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. **Journal Food Protection**, Ames, v. 57, n. 6, p. 522-527, 1994.

OLIVEIRA, M. S. et al. Incidência de aflatoxinas, desoxinivalenol e zearalenona em produtos comercializados em cidades do estado de Minas Gerais no período de 1998-2000. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 61, n. 1, p. 1-6, 2002.

ONO, E. Y. S. et al. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, n. 147, p.139-148, 1999.

ONO, E. Y. S. et al. Post-harvest storage of corn: effect of beginning moisture content on mycoflora and fumonisin contamination. **Food Additives and Contaminants**. v. 9, n. 11, p. 1081-1090, 2002.

ONO, E. Y. S.; BIAZON, L.; DA SILVA, M.; VIZONI, E.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. ; HIROOKA, E. Y. Fumonisins in corn: correlation with *Fusarium* sp. Count, damaged kernels, protein and lipid content. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 49, n. 1, p. 63-71, 2006.

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

ORUC, H. H.; CENGIZ, M.; KALKANLI, O. Comparasion of aflatoxin and fumonisin levels in maize grown in Turkey and imported from the USA. **Animal Feed Science and Technology**. n. 128, p. 337-341, 2006.

OSWEILER, G. D. et al. Effects of fumonisin-contaminated corn screenings on growth and health of feeder calves. **J. Anim. Sci.**, v. 71, p. 459-466, 1993.

OSWEILER, G. D.; ROSS, P. F.; WILSON, T. M.; et al. Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with fumonisin in corn screening. **J. Vet. Diag. Invest.**, v. 4, p. 53-59, 1992.

PACHECO, A. C.; DIETRICH, R. C. Avaliação de grãos ardidos em 32 híbridos de milho em Campo Erê - RS. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 3, p. 153-155, 1997.

PARANA CIDADE. Disponível em: <<http://celepar6.pr.gov.br/municipios/dadosger.asp?codigo=0286600>>. Acesso em : 28 jan. 2007.

\_\_\_\_\_. **File available through**. Disponível em: <<http://www.celepar.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=41>>. Acesso em: 13 Jan. 2007.

PARANÁ. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Economia Rural. **Perfil da Agropecuária Paranaense**. Curitiba, 2003. p. 94.

PAYNE, G. A. Aflatoxin in maize. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 10, n. 5, p. 423-440, 1992.

PINTO, N. F. J. A.; PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S. Proteção química e biológica de grãos de milho úmidos contra fungos de armazenagem e produção de aflatoxinas. **Revista Brasileira do Milho e Sorgo**, v. 4, n. 2, p. 172-179, 2005.

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

PROCTOR, R. H. et al. A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella Fujikuroi* Mating Population A. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, p. 100-112, 1999. Disponível em: <<http://www.idealibrary.com>>. Acesso em: 14 jul. 1999.

RHEEDER, J. P. et al. Fungal infestation and mycotoxin contamination of South African commercial maize harvested in 1989 and 1990. **S. Afr. J. Sci.**, v. 91, p. 127-131, 1995.

ROSS, P. F. et al. Concentrations of fumonisin B1 in feeds associated with animal health problems. **Mycopathologia**, v. 114, n. 3, p. 129-135, 1991.

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

SAMSON, R. A., et al. **O introduction to food-borne fungi**. 4. ed. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995

SANTINI, J. A. et al. Efeito do retardamento da colheita de milho na incidência de grãos ardidos e de fungos patogênicos. **Revista Brasileira do Milho e Sorgo**, v. 3, n. 2, p. 182-192, 2004.

SAUER, D. B. Effects of fungal deterioration on grain: nutritional value, toxicity, germination. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 7, p. 267-275, 1988.

SHEPHARD, G. S.; SYDENHAM, E. W.; THIEL, P. G.; GELDERBLUM, W. C. A. Quantitative determination of fumonisins Bi and B<sub>2</sub> by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Liq. Chromatogr.**, v. 13., p. 2077-2087, 1990.

SILVA, J. B. *et al.* Production of aflatoxins by *Aspergillus flavus* and of fumonisins by *Fusarium* species isolated from Brazilian sorghum. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 182-186, 2004.

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

SOTOMAYOR-RIOS, E.; WEIBEL, D. Grain crops. *In*: MARTIN, F. W. **Handbook of tropical food crops**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1987. p. 7-25.

STROKA, J.; OTTERDIJK, R.V. ; ANKLAM, E. Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices. **J. Chromat.**, v. 904, p. 251-256, 2000.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 175, p. 149-163, 1999.

SYDENHAM, E. W. *et al.* Fumonisin concentrations in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 994-997, 1992.

TANAKA, M. A. S. Sobrevivência de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho mantidas em duas condições de armazenamento. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 60-64, 2001.

TERAU, K.; UENO, Y. Morphological and functional damage to cells and tissues. *In*: URAGUCHI, K.; YAMAZAKI, M. **Toxicology, biochemistry and pathology of mycotoxins**. New York: Wiley, 1978. p. 189-210.

THIEL, P. G. *et al.* Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 1089-1093, 1991.

THRANE, U.; SEIFERT, F. Fungi species and their specific profiles of secondary metabolites. *In*: CHELKOWSKI, J. (Ed.). **Mycotoxins, taxonomy and pathogenicity**. Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 199-225.

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

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

VAN DER WESTHUIZEN, *et al.* Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5574-578, 2003.

VESONDER, R. F.; LABEDA, D. P.; PETERSON, R. E. Phytotoxic activity of selected water-soluble metabolites of *Fusarium* against *Lemna minor* (Duckweed). **Mycopathologia**, v. 118, p. 185-189, 1992.

VISCONTI, A.; BOENKE, A. **Improvement of the determination of fumonisins FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> in maize and maize based feeds**. Belgium: European Commission. BCR Information: Chemical Analysis, 1995.

VOSS, K. A.; CHAMBERLAIN, W. J.; BACON, C. W.; NORRED, W. P. A preliminary investigation on renal and hepatic toxicity in rats fed purified fumonisin B. **Nat. Toxins.**, v. 1, p. 222-228, 1993.

WANG, E.; NORRED, W. P.; BACON, C. W. *et al.* Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 14.486-14.490, 1991.

WEIBKING, T.; LEDOUX, D. R.; BERMUDEZ, A. J. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B<sub>1</sub>, on the young broiler chick. *Poultry Science*, v. 72, p.456-466, 1993.

WENTZEL, M. M. V. S. Fungos de armazenamento. *In*: SOAVE, J.; WENTZEL, M. M. V. S. (Ed.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill. 1987. p. 260-275.

WICKLOW, D. T.; HORN, B. W.; SHOTWELL, O. L.; *et al.* Fungal interference with *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of maize, grown in a controlled environment. **Phytopathology**, v. 78, p. 68-74, 1988.

WILSON, T. M.; ROSS, P. F.; RICE, L. G.; *et al.* Fumonisin B<sub>1</sub> levels associated with an epizootic of equine leucoencephalomalacia. **J. Vet. Diag. Invest.**, v. 2, p. 213-216, 1990.

WINDHAM, M. T.; KING, S. B. Microflora of roots of maize at seedling and silking stages in Mississippi. **Plant Disease**, v. 67, p. 1366-1368, 1983.

YATES, I. E. *et al.* Field performance of maize grown from *Fusarium verticillioides*-inoculated seed. **Mycopathologia**, v. 159, p. 65-73, 2005.

YOSHIZAWA, T.; YAMASHITA, A.; LUO, Y. Fumonisin occurrence in corn from high and low risk areas for human esophageal cancer in China. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1626-1629, 1994.

ZINEDINE, A. *et al.* Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. **Food Control**. v. 17, p. 868-874, 2006.

ZRANG, H.; NAGASHIMA, H.; GOT, T. Natural occurrence of mycotoxins in corn samples from high and low risk areas for human esophageal cancer in China. **Mycotoxins**, n. 44, p. 29-35, 1997.

ZUMMO, N.; SCOTT, G. E. Interaction of "*Fusarium moniliforme* and *Aspergillus flavus* on kernel infection and aflatoxin contamination in maize ears. **Plant Disease**, n. 76, p. 771-773, 1992.