

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**MICOTOXINAS EM CULTIVARES DE MILHO (*Zea mays* L.) E EM
PRODUTOS DE MILHO: AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA E DE
FATORES QUE CONTRIBUEM PARA A PRODUÇÃO NO CAMPO.**

PARECER

Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida por
Miguel Machinski Júnior, aprovada
pela Comissão Julgadora em 02
de agosto de 2000.

Campinas, 02 de agosto de 2000.



Prof.ª. Dra. Lúcia Maria V. Soares
Presidente da Banca

Prof.ª. Dr.ª. Lúcia Maria Valente Soares
Orientadora

Miguel Machinski Junior
Farmacêutico-Bioquímico
Mestre em Farmácia

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

CAMPINAS, SP
2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



2000 13 128

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	M184m
V.	Ex.
TOMBO BC/	42158
PROC.	16-278700
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	29/09/00
N.º CPD	

CM-00146997-3

1810 276908

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

M184m

Machinski Junior, Miguel

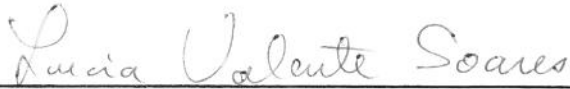
Micotoxinas em cultivares de milho (*Zea mays* L.) e em produtos de milho: avaliação da ocorrência e de fatores que contribuem para a produção no campo /Miguel Machinski Junior. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientador: Lúcia Maria Valente Soares

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Micotoxinas. 2.Aflatoxina. 3.Milho. I.Soares, Lúcia Maria Valente. II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

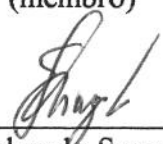


Prof.^a Dr.^a Lúcia Maria Valente Soares
(orientadora)



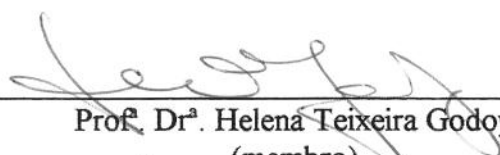
Prof. Dr. Benedito Corrêa
(membro)

Prof.^a Dr.^a Délia Rodriguez Amaya
(membro)



Dr. Eduardo Sawazaki
(membro)

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes
(membro)



Prof.^a Dr.^a Helena Teixeira Godoy
(membro)



Prof.^a Dr.^a Myrna Sabino
(membro)

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

SEÇÃO CIRCULANTE

Campinas, de de 2000.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

“Não basta a leitura sem a unção; não basta a especulação sem a devoção; não basta a pesquisa sem maravilhar-se; não basta a circunspecção sem o júbilo, o trabalho sem a piedade, a ciência sem a caridade, a inteligência sem a humildade, o estudo sem a graça”.

São Boaventura (1218-1274)

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Expresso, de maneira particular, meu profundo reconhecimento e gratidão,

À DEUS, por muitas e muitas razões,...

À minha querida esposa MARIA CRISTINA, pelo seu apoio, dedicação, auxílio e amor que foram de grandíssima importância à execução desta tese,

Aos meus filhos, MIGUEL LUCAS e “O QUE ESTÁ A CAMINHO”, por existirem...

À minha FAMÍLIA, que mesmo longe sempre fizeram-se presentes dando incentivo e apoio,

De modo especial, agradeço a Prof^ª. Dr^ª. LÚCIA M. VALENTE SOARES, pela solicitude com que sempre me orientou e cuja experiência científica tornou possível a realização desta pesquisa, em particular pela oportunidade e amizade.

AGRADECIMENTOS

Aos membros da banca examinadora, pelas sugestões apresentadas para a redação final da tese.

À Fundação para Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (FEA/Unicamp), pela boa acolhida e pelas facilidades oferecidas.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) pela oportunidade.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), na pessoa do Dr. Eduardo Sawazaki, pela disponibilização das amostras e pelo auxílio na parte estatística.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas (ITAL) e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (FEA/Unicamp), pelo empréstimo dos moinhos.

À Maria Cristina Rocco Machinski, pela correção ortográfica e gramatical.

À todos os amigos do Laboratório de Análise de Alimentos, pela amizade e bons momentos de convivência e que de várias formas auxiliaram na realização deste trabalho.

À todos os funcionários da FEA/Unicamp, pela cordialidade e disposição em ajudar.

Aos amigos do grupo Fonte Viva, pela intercessão.

Às professoras Ana Maria Itinose e Paula Nishiyama, pelo incentivo na realização desta tese.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa.

Muito obrigado.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ÍNDICE DE TABELAS	
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
RESUMO GERAL	v
GENERAL SUMMARY	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1.1. Fungos e micotoxinas em milho	4
Resumo	4
Introdução	5
Importância nutricional e econômica do milho	6
Principais micotoxinas que ocorrem em milho	8
Toxinas do <i>Fusarium</i>	8
Fumonisinhas	9
Zearalenona	11
Tricotecenos	13
Moniliformina	16
Aflatoxinas	17
Ocratoxina A	20
Fungos potencialmente toxigênicos em milho	22
Ocorrência de micotoxinas em milho no Brasil	26
Comentários finais	29
Referências bibliográficas	29
1.2. Fumonisinhas: aspectos analíticos	48
Resumo	48
Introdução	49
Extração	50
Limpeza	53
Detecção/quantificação	56
Cromatografia em camada delgada e cromatografia em camada delgada de alta eficiência.....	57
Cromatografia gasosa	58
Cromatografia líquida de alta eficiência	59
Espectrometria de massas	66
Eletroforese capilar	66
Imunoensaios	67

Confirmação	68
Estudos colaborativos	69
Conclusões	70
Referências bibliográficas	71

CAPÍTULO 2 - OTIMIZAÇÃO DE CONDIÇÕES ANALÍTICAS NA DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS B₁ E B₂ EM MILHO E AVALIAÇÃO DE DUAS COLUNAS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Resumo	80
Introdução	81
Material e métodos	83
Amostras	83
Padrões de fumonisinas B ₁ e B ₂	83
Solventes e reagentes	83
Fase móvel	84
Reagente de derivação (OPA)	84
Equipamentos	84
Otimização da separação cromatográfica das fumonisinas B ₁ e B ₂	85
Avaliação de sistemas de extração e limpeza	85
Avaliação de colunas de extração em fase sólida	85
Recuperação, repetibilidade e limites de detecção	86
Descontaminação do material	86
Resultados e discussão	86
Otimização das condições de detecção no cromatógrafo à líquido	86
Otimização das condições de eluição no cromatógrafo a líquido	87
Avaliação de sistemas de extração e limpeza	88
Avaliação da coluna de extração em fase sólida de troca aniônica forte	88
Recuperação, repetibilidade e limites de detecção	94
Conclusões	95
Referências bibliográficas	96

CAPÍTULO 3 – OCORRÊNCIA DE FUMONISINAS B₁ E B₂ EM TRÊS HÍBRIDOS DE MILHO CULTIVADOS NO BRASIL E SUA RELAÇÃO COM A MICROFLORA, CONDIÇÕES AMBIENTAIS, ÉPOCA DE CULTIVO E LOCAL DE PLANTIO

Resumo	102
Introdução	103
Material e métodos	105
Amostras	105
Delineamento experimental	105
Dados climatológicos	107
Determinação de Fumonisinas B ₁ e B ₂	107
Análise estatística	109
Resultados e discussão	110
Controle da qualidade analítica	110

Ocorrência de fumonisinas B ₁ e B ₂ em 3 híbridos de milho cultivados em 4 regiões do Estado de São Paulo, Brasil	110
Avaliação da influência das variáveis climáticas e micoflora na produção de fumonisinas nos híbridos analisados	118
Conclusões	122
Referências bibliográficas	122

CAPÍTULO 4 - OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS, OCRATOXINA A E ZEARALENONA EM CULTIVARES DE MILHO NO ESTADO DE SÃO PAULO, SAFRA 1997/1998	130
Resumo	131
Introdução	132
Material e métodos	134
Amostras	134
Delineamento experimental	135
Dados climatológicos	135
Padrões analíticos	137
Preparação das amostras	137
Extração e limpeza	137
Triagem e quantificação por cromatografia em camada delgada	138
Confirmação	138
Descontaminação do material	139
Análise estatística	139
Resultados e discussão	139
Conclusões	155
Referências bibliográficas	156

CAPÍTULO 5 - OCORRÊNCIA DE FUMONISINAS B₁ E B₂ EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS À BASE DE MILHO NO MERCADO BRASILEIRO	164
Resumo	165
Introdução	166
Material e métodos	168
Amostras	168
Determinação de Fumonisinas B ₁ e B ₂	169
Regeneração das colunas de troca aniônica	171
Descontaminação do material	171
Resultados e discussão	172
Controle de qualidade analítico	172
Ocorrência de fumonisinas	173
Conclusões	179
Referências bibliográficas	180

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Etapas envolvidas no procedimento analítico de fumonisinas	50
Tabela 2 - Levantamento de métodos para extração de fumonisinas em diversos substratos	52
Tabela 3 - Principais técnicas de limpeza dos extratos obtidos nas análises de fumonisinas	54
Tabela 4 - Valores de Rf das fumonisinas para diferentes sistemas-solventes e agentes cromogênicos ou de intensificação de fluorescência usados em CCD/CCDAE de fase normal ou reversa	57
Tabela 5 - Métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise de fumonisinas	60
Tabela 6 - Detecção e tempo de retenção do derivado FB ₁ -OPA em diferentes proporções de metanol-tampão fosfato pH 3,3 como fase móvel	87
Tabela 7 - Tempo de retenção em cromatografia a líquido de alta eficiência par FB ₁ em diferentes fases móveis	89
Tabela 8 - Solventes testados com colunas de troca aniônica forte para limpeza de extratos de milho na determinação de fumonisinas	91
Tabela 9 - Recuperação das fumonisinas adicionadas a milho quando são usadas colunas de extração em fase sólida de troca aniônica forte de diferentes marcas em mais de uma utilização por coluna	93
Tabela 10 - Resultados de precisão para FB ₁ e FB ₂ em amostras de milho enriquecida com 2 µg/g de FB ₁ +FB ₂	95
Tabela 11 - Épocas de plantio e colheita, ano agrícola 1994/95, dos híbridos de milho (BR 201, Cargill 901 e Contimax 322) em 4 regiões paulistas	106
Tabela 12 - Controle de qualidade do método de análise usado para determinação de fumonisinas B ₁ e B ₂	110
Tabela 13 - Ocorrência natural de fumonisinas B ₁ e B ₂ em 3 híbridos de milho provenientes de 4 estações experimentais do Estado de São Paulo, Brasil	114
Tabela 14 - Umidade, atividade de água e unidade formadoras de colônias de fungos do gênero <i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> e outros de 48 amostras de híbridos de milho coletados em 4 estações experimentais agrícolas do Estado de São Paulo, safra 1994/1995 (ALMEIDA, 1996)	121
Tabela 15 - Características dos cultivares de milho avaliados no Estado de São Paulo na safra de 1997/1998	136
Tabela 16 - Níveis de micotoxinas detectados em 36 cultivares de milho plantado em Capão Bonito, SP, safra 1997/1998	140
Tabela 17 - Níveis de aflatoxinas detectados em 36 cultivares de milho plantado em Ribeirão Preto, SP, safra 1997/1998	141
Tabela 18 - Níveis de aflatoxinas detectados em 38 cultivares de milho plantado em Votuporanga, SP, safra 1997/1998	142
Tabela 19 - Concentração média das aflatoxinas B ₁ e B ₂ em três regiões diferentes do Estado de São Paulo, Brasil, safra 1997/1998	143

Tabela 20	- Dados climatológicos das estações experimentais do Instituto Agronômico de Campinas: temperatura mínima, temperatura média e temperatura máxima (°C) no período de Outubro de 1997 a Abril de 1998	145
Tabela 21	- Níveis médios de aflatoxinas B ₁ e B ₂ em cultivares de milho avaliados simultaneamente nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico de Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, safra 1997/1998	145
Tabela 22	- Recuperação de amostras de produtos de milho enriquecida com FB ₁ e FB ₂ como controle nas análises dos produtos alimentícios à base de milho adquiridas no comércio de Campinas, Março a Maio de 1999	172
Tabela 23	- Teores de fumonisinas B ₁ e B ₂ encontrados em produtos alimentícios à base de milho adquiridos no comércio de Campinas, Março a Maio de 1999	174
Tabela 24	- Ocorrência de FB ₁ e FB ₂ em fubá	175

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Estrutura química de algumas micotoxinas encontradas em milho	8
Figura 2 - Estrutura química das principais fumonisinas	10
Figura 3 - Estrutura química da moniliformina	16
Figura 4 - Reação da amina primária da fumonisina com o o-ftaldialdeído (OPA) na presença de 2-mercaptoetanol para formar um derivado N-substituído 1-cianobenz(f)isoindol	63
Figura 5 - Reação da amina primária da fumonisina com o naftaleno-2,3-dicarboxaldeído (NDA) na presença do íon cianeto para formar um derivado estável	64
Figura 6 - Reação da amina primária da fumonisina com o 4-fluor-7-nitro-benzeno-2-oxa-1,3-diazol (NBD-F) para formar um derivado estável	65
Figura 7 - Cromatograma das fumonisinas B ₁ e B ₂ . Condições cromatográficas: coluna (250x4,6 mm) Varian (Walnut Creek, CA) empacotada com Microsorb-MV 5µm ODS de fase reversa; fase móvel composta por acetonitrila-água-ácido acético glacial (50:50:0,5-v/v/v) até 15 minutos, seguida por acetonitrila pura; comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 nm e 440 nm; fluxo de 1,0 mL/min	90
Figura 8 - Cromatograma de amostra de milho naturalmente contaminada com FB ₁ e FB ₂ . Condições cromatográficas: coluna (250x4,6 mm) Varian (Walnut Creek, CA) empacotada com Microsorb-MV 5µm ODS de fase reversa; fase móvel composta por acetonitrila-água-ácido acético glacial (50:50:0,5-v/v/v) até 15 minutos, seguida por acetonitrila pura; comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 nm e 440 nm; fluxo de 1,0 mL/min	90
Figura 9 - Concentração de FB ₁ em amostra de milho enriquecida (2µg/g) obtida após eluição com solventes de força iônica diferente em coluna de extração de troca aniônica forte	92
Figura 10 - Concentração de FB ₁ em amostra de milho enriquecida (2 µg/g) obtida com diferentes volumes do solvente de eluição (metanol-ácido acético glacial, 95:5-v/v) utilizado em colunas de extração de troca aniônica forte	92
Figura 11 - Curvas padrão de FB ₁ e FB ₂	94
Figura 12 - Os locais onde foram coletadas as amostras de grãos de milho no Estado de São Paulo	106
Figura 13 - Cromatograma de uma amostra de milho naturalmente contaminada com 4,9 e 1,8 µg/g de fumonisinas B ₁ e B ₂ , respectivamente. Condições cromatográficas: coluna (250x4,6 mm) Varian (Walnut Creek, CA) empacotada com Microsorb-MV 5µm ODS de fase reversa; fase móvel composta por acetonitrila-água-ácido acético glacial (50:50:0,5-v/v/v) até 15 minutos, seguida por acetonitrila pura; comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 nm e 440 nm; fluxo de 1,0 mL/min	111
Figura 14 - Níveis médios de FB ₁ e FB ₂ em 3 híbridos (BR 201, C 901 e CX 322) de milho provenientes do Estado de São Paulo, safra 1994/1995	112

Figura 15	- Níveis médios de FB ₁ e FB ₂ provenientes das regiões de Assis, Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, safra 1994/1995	115
Figura 16	- Temperatura mínima mensal para quatro localidades paulistas	115
Figura 17	- Temperatura máxima mensal para quatro localidades paulistas	116
Figura 18	- Total pluviométrico mensal para quatro localidades paulistas	116
Figura 19	- Distribuição em níveis das fumonisinas B ₁ +B ₂ em 3 híbridos de milho plantado em 4 estações experimentais de São Paulo, na safra 1994/1995	118
Figura 20	- Estações experimentais utilizadas em 1997/98 no Estado de São Paulo: Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga	134
Figura 21	- Índice pluviométrico (mmH ₂ O) entre o período de plantio e colheita de milho no Estado de São Paulo nas estações experimentais agrícolas de Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, safra 1997/1998	144
Figura 22	- Concentração média de aflatoxinas B ₁ + B ₂ em cultivares de milho com diferentes tipos de cultivar nos campos experimentais do Instituto Agrônomo em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, safra 1997/1988	148
Figura 23	- Concentração média de aflatoxinas B ₁ + B ₂ em cultivares de milho com diferentes tipos de endosperma nos campos experimentais do Instituto Agrônomo em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, safra 1997/1988	149
Figura 24	- Concentração média de aflatoxinas B ₁ + B ₂ em cultivares de milho com diferentes tipos de ciclo vegetativo nos campos experimentais do Instituto Agrônomo em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, safra 1997/1988	150
Figura 25	- Níveis médios de fumonisinas B ₁ e B ₂ encontrados em produtos alimentícios à base de milho em Campinas, Brasil	176
Figura 26	- Distribuição de frequência da contaminação por fumonisinas B ₁ , B ₂ , B ₁ +B ₂ em 81 produtos alimentícios à base de milho adquiridos no comércio de Campinas, Brasil	178

RESUMO GERAL

As micotoxinas presentes em milho, são metabólitos secundários produzidos, principalmente, por espécies dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. São toxinas que apresentam efeitos tóxicos agudos e crônicos em diversos animais de experimentação, assim como em animais domésticos. Em humanos, estão associadas epidemiologicamente com determinadas doenças em diversas regiões do mundo.

O presente trabalho teve por objetivos: 1- avaliar a presença de fumonisinas, aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em amostras de milho recém-colhido; 2- pesquisar a ocorrência de fumonisinas em produtos alimentícios à base de milho; 3- avaliar os efeitos de fatores bióticos (duração do ciclo vegetativo, tipo de cultivar, tipo de endosperma) e abióticos (local de plantio, diferentes épocas de cultivo, condições climáticas) na produção de micotoxinas em milho.

Numa primeira etapa do trabalho, o método de SHEPHARD et alii (1990) utilizado para a determinação de fumonisinas em milho, por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência, foi otimizado para as condições do laboratório. A extração com metanol-água (3:1, v/v) foi mantida. Os volumes de solvente no condicionamento e lavagem da coluna de extração em fase sólida de troca aniônica forte, usadas na etapa de limpeza dos extratos, foram aumentados para 10 mL e o volume e composição do solvente de eluição alterado para 20 mL de metanol-ácido acético glacial (95:5, v/v). Na etapa de cromatografia líquida de alta eficiência, a fase móvel foi modificada para acetonitrila-água-ácido acético glacial (50:50:0,5, v/v/v) durante os primeiros 15 minutos, seguida de acetonitrila pura até o final da corrida. As recuperações médias obtidas foram de 95 e 76%, e os limites de detecção de 20 e 40 ng/g, para fumonisinas B₁ e B₂, respectivamente. Os coeficientes de variação médios para

amostras artificialmente contaminadas foram de 5,8 e 13,4% para fumonisinas B₁ e B₂, respectivamente.

A ocorrência de fumonisinas foi avaliada em 48 amostras de três híbridos de milho (BR 201, Cargill 901 e Contimax 322) colhidas em 4 estações experimentais do Instituto Agrônomo de Campinas, localizados em diferentes regiões do Estado de São Paulo (Assis, Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga), escolhidas por sua importância para a cultura de milho. Todos os híbridos analisados mostraram uma contaminação por fumonisinas B₁ e B₂ variando de 0,23 a 15,96 µg/g e de 0,13 a 7,01 µg/g, respectivamente. Não houve correlação entre a contaminação encontrada e as variáveis duração do ciclo vegetativo, unidades formadoras de colônias por grama de produto (UFC/g), gênero de fungos presentes nas amostras e localização geográfica. Altas temperaturas e níveis pluviométricos elevados mostraram uma forte correlação com a acumulação de fumonisinas no milho proveniente das estações experimentais na safra 1994/1995. Estes resultados apontam a safra normal (verão) como a época do ano em que a produção das fumonisinas é mais elevada.

A contaminação com aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona em milho recém-colhido foi investigada por cromatografia em camada delgada, em 110 amostras de 48 genótipos de milho colhidos em 3 localidades do Estado de São Paulo (Estações Experimentais de Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga do Instituto Agrônomo de Campinas), através do método de SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA (1989). A presença ou não de aflatoxinas e seus níveis variaram amplamente entre os cultivares analisados, de não detectadas (nd) a 1600 µg/kg para B₁, de nd a 192 µg/kg para B₂, de nd a 280 µg/kg para G₁ e de nd a 69 para G₂. Apenas duas amostras apresentaram-se contaminadas com ocratoxina A (128 e 206 µg/kg) e somente uma com zearalenona (4640 µg/kg). Nenhuma correlação foi encontrada entre a contaminação por aflatoxinas B₁ e B₂, e tipo de cultivar, tipo de endosperma e duração do ciclo vegetativo. Local de plantio e períodos de ausência de chuvas associados a calor intenso, na fase de florescimento e enchimento dos grãos, foram os fatores que mais se mostraram

significativos para a presença de aflatoxinas em milho proveniente das estações experimentais na safra de 1997/1998.

A ocorrência de fumonisinas foi também avaliada em 81 amostras de alimento à base de milho obtidas no comércio da cidade de Campinas, São Paulo. Quarenta amostras foram positivas para fumonisina B₁ (0,03 a 4,93 µg/g) e quarenta e quatro amostras para fumonisina B₂ (0,02 a 1,38 µg/g). Estes resultados indicam que há um risco a saúde humana pela exposição às fumonisinas através do consumo de alguns alimentos à base de milho.

GENERAL SUMMARY

Mycotoxins are produced in maize mainly by fungi belonging to the genera *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium*. These toxins affect laboratory and domestic animal and are epidemiologically associated with human diseases reported in some areas of the globe.

The present work aimed at evaluating: 1- the accumulation of fumonisins, aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in freshly harvested corn; 2- the occurrence of fumonisins in corn and corn products; 3- the effects of biotic factors (length of vegetative cycle, type of cultivar, type of endosperm) and abiotic (geographic location, different planting times within the year, weather conditions) in the production of the mycotoxins in corn.

As a preliminary step in the work, the method developed by SHEPHARD and co-workers (1990) for the determination of fumonisins in corn and using high performance liquid chromatography with fluorescence detection, was optimized for the conditions of the laboratory. The extraction of samples with methanol-water (3:1, v/v) was maintained. The volumes of solvent for conditioning and washing of the SPE strong anionic exchange column in the cleanup step were increased to 10 mL and the eluting solvent was altered to 20 mL of methanol-acetic acid (95:5). At the HPLC step, the mobile phase was changed to acetonitrile-water-acetic acid (50:50:0.5, v/v/v) during the first 15 minutes and then changed to pure acetonitrile. The average recoveries were 95 and 76% and detection limits were 20 and 40 ng/g for FB₁ and FB₂, respectively. The average RSDs, for artificially contaminated samples, were 5.8 and 13.4% for FB₁ and FB₂, respectively.

The occurrence of fumonisins was evaluated in 48 samples of three freshly harvested maize hybrids (BR 201, Cargill 901, and Contimax 322) planted at 4 experimental stations belonging to the Instituto Agronômico de Campinas and located in major corn growing

areas of the state of São Paulo (Assis, Capão Bonito, Ribeirão Preto, and Votuporanga). All samples were contaminated with FB₁ and FB₂ at levels ranging from 0.23 to 15.96 µg/g and from 0.13 to 7.01 µg/g, respectively. No correlation was found between the fumonisins levels and the length of the vegetative cycle, number of colony forming units per gram of product (CFU/g) or genera of fungi present in the samples. High temperatures and rainfall were the only factors with significance to the accumulation of fumonisin in the corn samples from the 1994/1995 harvest at the experimental stations. These results point to the normal corn planting period (Summer) as the time of the year when the fumonisin production is higher.

Freshly harvested corn (110 samples corresponding to 48 cultivars) from 3 locations of the state of São Paulo (the Instituto Agronômico de Campinas Experimental Stations of Capão Bonito, Ribeirão Preto, and Votuporanga) were analyzed for aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂, ochratoxin A and zearalenone. A thin-layer chromatographic method (SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA, 1989) was used. The incidence and levels of aflatoxins varied greatly among the samples and ranged from not detected to 1600 µg/kg for AFB₁, from not detected to 192 µg/kg for AFB₂, from not detected to 280 µg/kg for AFG₁, and from not detected to 69 µg/kg for AFG₂. Only two samples contained ochratoxin A (128 and 206 µg/kg) and in only one zearalenone was present (4640 µg/kg). No correlation was found between the contamination of the maize with aflatoxins B₁ and B₂ and type of cultivar, type of endosperm, and length of the vegetative cycle. However, a strong correlation was found between the contamination with the aflatoxins B₁ and B₂ and the geographic location associated with low rainfall and high temperatures during the flowering and grain filling stages.

Eighty one samples of corn-based foods acquired in shops and food markets in the city of Campinas, state of São Paulo, were analyzed for fumonisins. Forty samples contained FB₁ (0.03 to 4.93 µg/g) and forty four samples contained FB₂ (0.02 to 1.38). These results indicate the ingestion of corn-based products as a risk for the population.

INTRODUÇÃO GERAL

A cultura de milho tem assumido uma grande importância para o país em função do aumento no consumo deste cereal. No período transcorrido entre 1990 e 1995, por exemplo, houve um aumento de 42,5% no consumo. Nota-se também que a evolução do consumo interno de milho está na dependência do crescimento dos setores produtores de frangos e suínos, responsáveis por 45% da demanda total do cereal. Esses setores, ultimamente, estão crescendo entre 8 e 10% ao ano, incentivados por elevado aporte tecnológico, que vem permitindo a colocação desses produtos no mercado, a preços competitivos com a carne bovina.

As regiões Sul e Sudeste do Brasil, maiores produtoras de milho, representam cerca de 80% da produção nacional. Nos três últimos anos agrícolas, cultivou-se em torno de 1,2 milhão de hectares de milho em São Paulo, sendo 2/3 na safra de verão e 1/3 no outono-inverno ("safrinha"). O Estado de São Paulo caracteriza-se climaticamente por meses de verão com altas temperaturas e alta pluviosidade contrastando com os meses de inverno que são caracterizados pela diminuição acentuada do índice pluviométrico e temperatura. Durante a safra de verão pode ocorrer os "veranicos", ou seja, ausência de chuvas e calor intenso. Ocorre também uma irregularidade na distribuição das chuvas, denominada de "chuvas de manga". Tal situação climática, coincidindo com a época de florescimento e enchimento dos grãos de milho, torna a semente mais susceptível a contaminação por fungos de campo, principalmente do gênero *Fusarium*.

As diferentes espécies de *Fusarium* podem produzir diversas micotoxinas, tais como, fumonisinas, tricotecenos e zearalenona. As fumonisinas são um grupo de micotoxinas, onde a fumonisina B₁ é a mais importante porque constitui até 70% do total de fumonisinas, tanto em cultura de laboratório quanto em milho naturalmente contaminado, além de ser a mais tóxica. Os principais efeitos tóxicos relatados são a leucoencefalomalácia em equinos, edema pulmonar e

hidrotórax em suínos, hemorragia cerebral em coelhos e câncer hepático em ratos. Em humanos está associada epidemiologicamente com câncer de esôfago. Os tricotecenos, por sua vez, constituem um grupo de mais de cem compostos sesquiterpenóides, com diferentes níveis de toxicidade. Vômitos, diarreia, irritação na pele, leucopenia, alterações no sistema hematopoiético e linfocitário tem sido os principais sintomas relatados em animais e humanos. Já a zearalenona é uma toxina de caráter estrogênico e seus efeitos são frequentemente observados em animais domésticos que consomem grãos ou rações contaminados.

Os fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* também podem invadir os grãos de milho, principalmente em situação de estresse hídrico ou ação de agentes externos, como os insetos e pássaros. Estes fungos produzem diversas micotoxinas, mas são mais conhecidas as aflatoxinas e a ocratoxina A. As aflatoxinas são hepatotóxicas, mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas, representam um risco à saúde pública, havendo pois a necessidade de desenvolver medidas de controle durante o processo de produção de milho. A aflatoxina B₁ está associada epidemiologicamente com câncer hepático. A ocratoxina A é nefrotóxica, principalmente em suínos, e parece estar associada na etiologia da nefropatia endêmica dos Balcãs.

O presente trabalho teve por objetivos: 1- avaliar a presença de fumonisinas, aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em amostras de milho recém-colhido; 2- pesquisar a ocorrência de fumonisinas em produtos alimentícios à base de milho; 3- avaliar os efeitos de fatores bióticos (duração do ciclo vegetativo, tipo de cultivar, tipo de endosperma) e abióticos (local de plantio, diferentes épocas de cultivo, condições climáticas) na produção de micotoxinas em milho.

Capítulo 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. FUNGOS E MICOTOXINAS EM MILHO

RESUMO

As micotoxinas presentes em milho são produzidas principalmente por fungos dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. São micotoxinas que apresentam efeitos tóxicos agudos em animais, além de serem agentes teratogênicos, mutagênicos ou carcinogênicos. Através da ingestão de milho e de seus produtos, seres humanos e animais estão expostos a possibilidade de ingestão de um grande número de micotoxinas. Dentre as que causam maior preocupação, tanto do ponto de vista de saúde pública como econômico, estão fumonisinas, zearalenona, tricotecenos, aflatoxinas, ocratoxina A e moniliformina. A presente revisão tem como objetivo contribuir para o entendimento dos riscos para seres humanos e animais causados pelo aparecimento de micotoxinas em milho assim como avaliar o conhecimento atual com relação a micotoxinas em milho no Brasil.

Unitermos: Micotoxinas, Milho, Fungos toxigênicos.

INTRODUÇÃO

As micotoxinas, produtos do metabolismo secundário de alguns fungos filamentosos (bolors) que proliferam em alimentos e ração animal, acarretam, quase sempre, graves danos à saúde do homem e dos animais (GOLDBLATT, 1977). Os principais fungos implicados em casos de micotoxicoses pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*.

As micotoxinas foram descobertas pela ciência e começaram a ser estudadas após o acidente econômico ocorrido na Inglaterra em 1960, quando em poucas semanas cem mil filhotes de perus e outros milhares de filhotes de outros tipos de aves pereceram de hepatite aguda necrosante, após a ingestão de ração à base de amendoim procedente do Brasil. Posteriormente os agentes responsáveis pelas mortes foram identificados como micotoxinas (aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂) produzidas pelo *Aspergillus flavus* (NRIAGU & SIMMONS, 1990).

Os diferentes fungos produtores de micotoxinas são encontrados em todas as regiões do mundo e podem crescer em uma grande variedade de substratos e sob várias condições de umidade, pH e temperatura. Assim, os alimentos estão sujeitos à invasão por fungos e contaminação com micotoxinas no campo antes, durante e após a colheita, no processamento, no transporte e na estocagem (SABINO, 1996).

ZUMMO & SCOTT (1992) demonstraram que o milho (*Zea mays* L.) é constantemente exposto ao risco de desenvolvimento de fungos toxigênicos por possuir uma composição ideal de nutrientes. Dentre as micotoxinas encontradas em milho, destacam-se as fumonisinas, as aflatoxinas, a zearalenona, a ocratoxina A, os tricotecenos e a moniliformina.

O objetivo da presente revisão é apresentar as características gerais, os aspectos toxicológicos e a ocorrência das micotoxinas presentes no milho.

IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL E ECONÔMICA DO MILHO

O milho, cientificamente designado *Zea mays* L., é uma planta alta, robusta, monocotiledônea, pertencente a família das gramíneas, largamente utilizada como fonte de alimento em vários países (FANCELLI, 1983). No Brasil, o milho se destaca entre as graníferas por ser o primeiro em área cultivada e volume de produção e pela participação preponderante das empresas privadas na pesquisa, produção e comercialização das sementes melhoradas (DUARTE & PATERNIANI, 1998). Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, logo após os Estados Unidos e China, tendo sua produção ficado, nos últimos nove anos, em torno de 31 milhões de toneladas (IBGE, 1999).

O Estado de São Paulo foi responsável por 10,6% da produção nacional de milho em 1998 (IBGE, 1999). A cultura do milho é uma das mais importantes no Estado de São Paulo, ultrapassando 1,3 milhões de hectares cultivados. O maior canal de utilização do milho é em ração animal, onde este participa com até 63% na formulação de rações para aves e com até 75% para as de suíno (NOGUEIRA Jr. et alii, 1987).

Segundo PEDROSA & DEZEN (1991), o destino da produção nacional de milho está em diversos setores, sendo a suinocultura e a avicultura responsáveis pela maior parte da utilização dos grãos (41%). O restante da produção divide-se entre a indústria (13,5%), a formulação de rações de outras espécies animais (5,6%) e produção de sementes (0,6%). A não comercialização de 39,3% dos grãos produzidos deve-se, principalmente, ao consumo na propriedade rural, na ordem de 24,7%. O restante dessa não comercialização encontra escoamento no consumo humano nas grandes cidades (4,4%) e nas perdas durante a colheita e armazenamento, responsáveis por 9,9% do total produzido no país.

A contribuição nutricional do grão de milho propicia que este cereal seja utilizado no preparo de muitos derivados, sendo a base de complexos industriais diversificados e, nos dias atuais, um relevante fator sócio-econômico para muitas regiões do mundo (NOGUEIRA Jr. et alii, 1987). Segundo FANCELLI (1983), na constituição do milho encontramos, em média, 70% de carboidratos, 10% de proteínas, 4% de lipídios, além de minerais e vitaminas.

O milho é processado principalmente por duas vias: moagem a seco e moagem úmida, obtendo-se diferentes produtos destinados ao preparo de alimentos, farelos para rações e outros usos industriais. A industrialização a seco é atividade de longa tradição no Brasil, tendo-se iniciado no passado com a moagem caseira de milho não degerminado para se obter o fubá integral, passando pelo estágio de pequenos moinhos regionais, até se transformar em setor industrial de destaque com alta tecnologia (SETTI, 1992). Na moagem a seco, os produtos principais são: o fubá comum, a canjica, fubá mimoso ou de canjica, a quirera e os farelos para rações. Todos eles são obtidos do endosperma e só se diferenciam no tamanho da partícula. Como sub-produto da produção de canjica resta o germe, destinado às fábricas de óleo (PALOMINO et alii, 1997). Na moagem úmida, os derivados principais são o amido e seus subprodutos. O amido é o produto mais importante, seja para uso direto ou como matéria-prima para um número muito grande de outros derivados. Os subprodutos possuem alto valor comercial: o germe é destinado às fábricas de óleo, a água de maceração é usada nas indústrias de fermentação e de ração, e o glúten e o farelo na preparação de rações (PALOMINO et alii, 1997).

Os produtos tradicionalmente consumidos no Brasil e mais populares são a farinha, a canjica (grão inteiro degerminado) e o fubá. Entretanto, novos produtos têm surgido para atender uma faixa de consumidores mais reduzida e exigente (NOGUEIRA Jr. et alii, 1987).

PRINCIPAIS MICOTOXINAS QUE OCORREM EM MILHO

Para facilitar o estudo das micotoxinas pode-se classificar as micotoxinas mais estudadas e relacionadas com milho, em 3 grandes grupos: (1) toxinas do *Fusarium*, representadas pelas fumonisinas, zearalenona, tricotecenos e moniliformina; (2) aflatoxinas, produzidas pelo *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, e (3) ocratoxinas, produzidas pelo *Aspergillus alutaceus* (*A. ochraceus*) e várias espécies do gênero *Penicillium* (Figura 1).

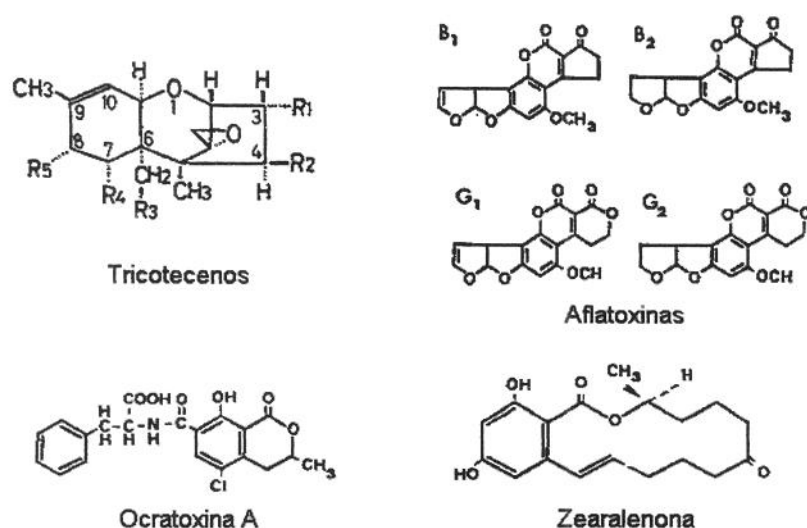


Figura 1 - Estrutura química de algumas micotoxinas encontradas em milho.

Toxinas do *Fusarium*

O gênero *Fusarium* tem ampla distribuição mundial e é encontrado tanto no solo quanto na superfície das plantas. Apesar de algumas espécies, tal como o *F. moniliforme*, estar associada com o clima tropical e subtropical, e outras, como o *F. sporotrichioides*, com clima frio, muitas espécies ocorrem em partes temperadas do mundo (SMITH & MOSS, 1985).

Fumonisin

As fumonisin são um grupo de micotoxinas produzidas principalmente pelo *Fusarium moniliforme* (GELDERBLOM et alii, 1988) e *F. proliferatum* (NELSON et alii, 1992), frequentemente isolados de milho. Outras espécies de *Fusarium*, como: *F. subglutinans*, *F. nygamai*, *F. napiforme*, *F. anthophilum*, *F. dlamini* (NELSON et alii, 1992), *F. oxysporum* var. *redolens* (ABBAS et alii, 1995) e *F. polyphialidicum* (ABBAS & OCAMB, 1995), e a *Alternaria alternata* f. sp. *lycorpersici* (CHEN et alii, 1992), também produziram fumonisin B₁ (FB₁) em condições de laboratório.

Desde o isolamento e caracterização destas micotoxinas em 1988 por GELDERBLOM et alii (1988) e BEZUIDENHOUT et alii (1988), várias fumonisin foram identificadas (A₁, A₂, A₃, AK₁, B₁, B₂, B₃, B₄, C₁, C₃, C₄, P₁, P₂, P₃, PH_{1a}, PH_{1b}) (BEZUIDENHOUT et alii, 1988; CAWOOD et alii, 1991; MUSSER & PLATTNER, 1997; SEO & LEE, 1999) (Figura 2).

A FB₁ é a mais importante do grupo, constituindo até 70% do total das fumonisin, tanto em cultivo de laboratório quanto em milho naturalmente contaminado, além de ser a mais tóxica (CAWOOD et alii, 1991). Essa micotoxina causa leucoencefalomalácia em equinos (LEME) (KELLERMAN et alii, 1990; ROSS et alii, 1990), edema pulmonar e hidrotórax (EPS) em suínos (HARRISON et alii, 1990; COLVIN & HARRISON, 1992), hemorragia cerebral em coelhos (BUCCI et alii, 1996) e câncer hepático em ratos (GELDERBLOM et alii, 1991). As FB₂ e FB₃ também já foram associadas a câncer hepático em ratos (GELDERBLOM et alii, 1992).

As fumonisin têm sido associadas epidemiologicamente com câncer de esôfago em humanos na região de Transkei na África do Sul (RHEEDER et alii, 1992), na região de Lixian na China (CHU & LI, 1994), nordeste da Itália (DOKO & VISCONTI, 1994) e em

Charleston, sudeste dos Estados Unidos (SYDENHAM et alii, 1991). Nestas regiões o milho é um importante componente na dieta alimentar da população, e os dados preliminares mostraram que o milho consumido apresentava elevados teores de fumonisinas. Com base nas informações toxicológicas disponíveis, a *Agência Internacional sobre Pesquisa do Câncer* (IARC) classificou as toxinas do *F. moniliforme*, incluindo as fumonisinas, como substâncias da classe 2B, isto é, possivelmente carcinogênica para o homem (IARC, 1993).

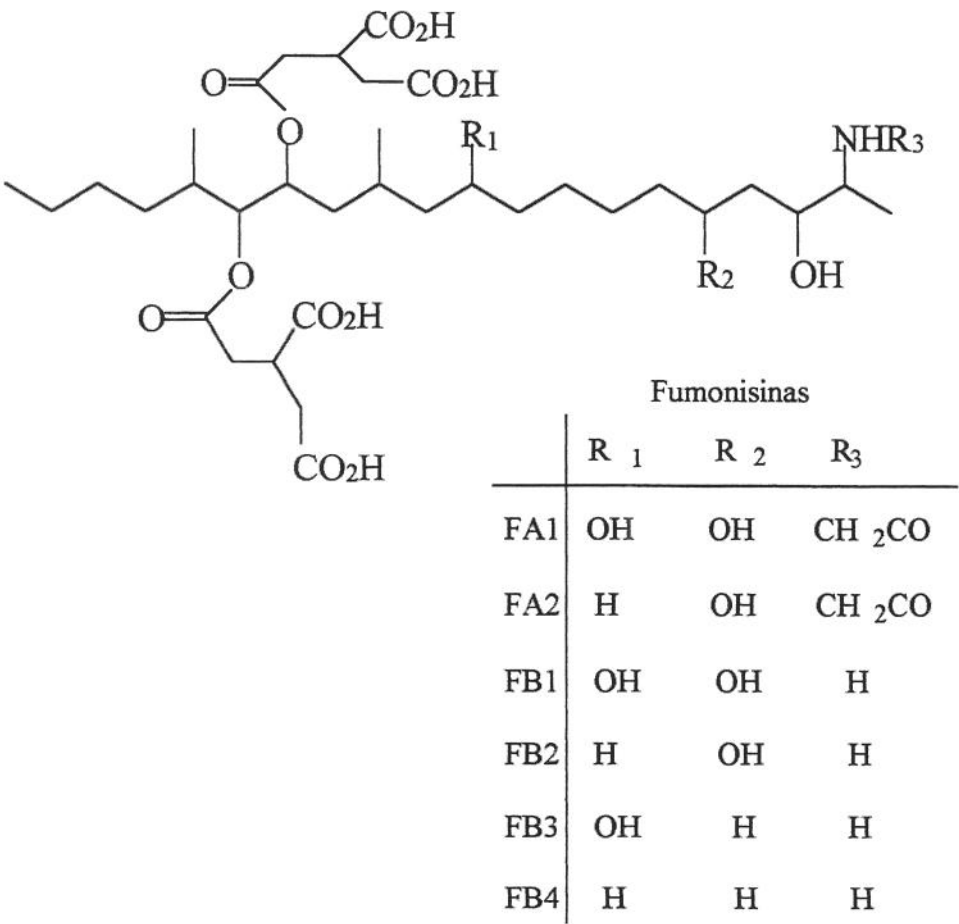


Figura 2 – Estrutura química das principais fumonisinas.

Levantamentos realizados em diversas partes do mundo mostram que o milho usualmente está contaminado com fumonisinas porém em níveis variáveis (BULLERMAN, 1996; BULLERMAN & TSAI, 1994; DOKO & VISCONTI, 1994; SHEPHARD et alii, 1996). Note-se que o *Fusarium moniliforme* é o fungo mais frequentemente isolado em milho (BURGUESS et alii, 1981; MARASAS et alii, 1978 e 1979; NELSON, 1992; ORSI et alii, 2000; POZZI et alii, 1995).

As fumonisinas não são destruídas por muitos métodos usados no processamento de alimentos (BULLERMAN & TSAI, 1994). Os efeitos do aquecimento não são completamente claros, pois alguns relatos indicam uma significativa redução na concentração de fumonisinas acima de 150°C (JACKSON et alii, 1996; MURPHY et alii, 1996). Entretanto, outros relatos demonstraram que as concentrações de fumonisinas não são reduzidas pelo aquecimento (SYDENHAM et alii, 1995).

Em termos mundiais não há regulamentação para os níveis de fumonisinas em alimentos, com exceção da Suíça, a qual propõe um limite de tolerância temporário de 1 µg/g para a somatória de FB₁ e FB₂ (FAO, 1997). Segundo RILEY et alii (1993), são recomendados níveis menores que 5 µg/g de FB₁ em ração para cavalos e outras espécies de eqüinos, 10 µg/g para ração de suínos e 50 µg/g na ração para gado de corte e frango de corte.

Zearalenona

A zearalenona (ZEA) (C₁₈H₂₂O₅) é uma lactona do ácido fenólico resorcílico (Figura 1) (OMS, 1983). Apesar de ser uma lactona com um grande anel, compreendendo 13 carbonos, é estável ao rompimento hidrolítico. Isto é atribuído à presença de um grupo metil secundário que impede os ataques nucleofílicos na carbonila da lactona (SABINO, 1996).

A ZEA, também chamada de toxina F₂, é um metabólito produzido por várias espécies de *Fusarium*, como: *F. graminearum* (sin. *F. roseum*), *F. nivale*, *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum*, *F. lacteritium* e *F. moniliforme* (BETINA, 1984). No Japão esta micotoxina foi isolada do *F. roseum*, *F. lacteritium* e *F. tricinctum* (ISHII et alii, 1974). Na Itália, a ZEA foi encontrada em sementes de milho infectada pelo *F. moniliforme* e *F. graminearum* (BOTTALICO, 1979). Três espécies produtoras de ZEA foram isoladas de sementes de milho da região de Transkei (África do Sul), são elas: *F. graminearum*, *F. moniliforme* e *F. subglutinans* (MARASAS et alii, 1979). HOLMBERG & PETERSON (1986) verificaram que o *F. culmorum*, um habitante do solo, também é produtor de ZEA. O *F. equiseti* isolado de milho, trigo e cevada também é capaz de produzir a ZEA (PASTER et alii, 1991).

A ZEA é responsável pela síndrome estrogênica em suínos (MIROCHA & CHRISTENSEN, 1974; PRELUSKY et alii, 1994) relatada pela primeira vez por McNUTT et alii (1928) em porcos que haviam se alimentado de milho. O hiperestrogenismo em suínos caracteriza-se por um aumento do útero e glândulas mamárias, edema vulvar, atrofia testicular e prolapso vaginal em alguns animais (BETINA, 1984). As observações em porcas durante o período de gestação, que receberam intramuscularmente doses diárias de ZEA, indicaram que a ZEA é teratogênica, causando malformações nas patas traseiras dos fetos (MILLER et alii, 1973). No entanto, não foram observados efeitos teratogênicos em aves e ratos, segundo SPEERS et alii (1971) e BAILEY et alii (1976), respectivamente.

Puberdade precoce e ginecomastia em humanos foram observadas em Porto Rico, havendo uma correlação com a alta incidência de ZEA nos alimentos à base de milho. Tem sido sugerido que a ZEA pode estar envolvida na etiologia dos tumores de mama (KUIPER-GOODMAN et alii, 1987).

A IARC ao avaliar a carcinogenicidade da ZEA definiu como um possível carcinógeno para o homem (IARC, 1993).

ZEA tem sido encontrada em milho em várias partes do mundo (DOKO et alii, 1996; PARK et alii, 1996; RESNIK et alii, 1996; SABINO et alii, 1989; SCOTT, 1997; TANAKA et alii, 1988). Nota-se que países de clima quente não têm apresentado problemas com contaminação de milho por ZEA. No entanto, os países de clima temperado e frio tem apresentado altos níveis e altas porcentagens de contaminação do milho por esta toxina (BHAVANISHANKAR & SHANTHA, 1987; EPLLEY et alii, 1974; HENNIGEN & DICK, 1995; HUSSEIN et alii, 1989; LAUREN et alii, 1991; L'VOVA et alii, 1993; MILANEZ et alii, 1998; RHEEDER et alii, 1995; SHOTWELL et alii, 1971; SINHA, 1990; YAMASHITA et alii, 1995).

Não há processos eficazes na remoção ou destruição de zearalenona em milho (BENNETT & ANDERSON, 1978), portanto, programas de prevenção são importantes para reduzir os níveis de ZEA em milho.

As relações de comércio internacional podem ser afetadas devido aos limites de tolerância estabelecidos por vários países para ZEA em milho. Em geral, o limite de tolerância é de 200 µg/kg (RESNIK et alii, 1996). Na Bélgica o limite é zero para todos os alimentos (MIROCHA, 1983).

Tricotecenos

Os tricotecenos são formados por anéis tricotecanos que apresentam uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 e um grupamento epóxido nas posições doze e treze da estrutura (Figura 1). Substituintes como: hidrogênios, hidroxilas, acilas, epóxidos ou ésteres podem estar presentes nos carbonos 3, 4, 7, 8, 14 e 15 (EPPLEY, 1979; SNYDER, 1986; UENO, 1986).

Considerando estes substituintes, existe uma classificação dos tricotecenos em quatro grupos: A, B, C e D. No grupo A estão os tricotecenos cuja posição 8 tem como substituintes grupos acilados ou hidroxilas, como a toxina T-2 e o diacetoxiscirpenol. O grupo B é constituído por compostos onde na posição 8 está um grupamento cetônico, assim como o nivalenol e o desoxinivalenol. Os tricotecenos do grupo C possuem dois grupamentos epóxidos, como a crotocina. Tricotecenos macrocíclicos constituem o grupo D, onde estão a roridina, a verrucarina e a satratoxina (SNYDER, 1986; UENO, 1986). Mais recentemente vem sendo acrescentado um quinto grupo a esta classificação, constituído por compostos tricotecanos que não possuem epóxido na estrutura (UENO, 1986).

Uma outra classificação considera a presença ou não de anéis macrocíclicos ligados ao carbono 4 e carbono 5, nomeando-os tricotecenos macrocíclicos e não macrocíclicos (SNYDER, 1986; UENO, 1983).

Os tricotecenos são metabólitos produzidos por fungos dos gêneros *Fusarium*, *Myrothecium*, *Tricothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporum* e *Stachybothrys* (EPPLEY et alii, 1974; UENO, 1983; SNYDER, 1986; SCOTT, 1988). Um ou mais tricotecenos tem sido produzidos de cepas das seguintes espécies de *Fusarium*: *F. episphae*, *F. lateritium*, *F. nivale*, *F. oxysporum*, *F. rigidisculum*, *F. solani*, *F. graminearum* e *F. tricinctum* (sin. *F. sporotrichioides*) (OMS, 1983).

Do ponto de vista sistêmico, a ação tóxica dos tricotecenos apresenta duas manifestações principais. A primeira, é a inibição da síntese protéica pela ligação do grupo epóxido do tricoteceno com o grupamento sulfidrila dos aminoácidos que compõe a peptidil transferase (SNYDER, 1986; UENO, 1977; UENO, 1986). Resultando em alterações do sistema hematopoiético e linfático, aplasia medular nos casos severos e imunodepressão. A segunda, é a atuação dos tricotecenos sobre as aminas biogênicas do cérebro, o que causa a recusa da alimentação (UENO, 1983). O fato destas micotoxinas atingirem diversos órgãos tem chamado a

atenção dos pesquisadores. Os tricotecenos são substâncias com potente ação irritante local, tanto de mucosas como de pele (UENO et alii, 1973). O único tricoteceno que demonstrou atividade teratogênica foi a toxina T-2, em camundongos (SNYDER, 1986).

Embora surtos em animais, ocasionados por toxinas de *Fusarium* e *Stachybotrys*, sejam conhecidos desde o século XVIII, o papel dos tricotecenos como agentes etiológicos destas doenças só foi caracterizado na década de sessenta (UENO, 1983). Na ocasião, foi demonstrado que a presença da toxina T-2 em rações era a responsável pela morte de vacas leiteiras que consumiam esta ração contaminada (HSU et alii, 1972).

O surto clássico de fusariotoxicose em humanos, que registrou casos fatais, ocorreu após a segunda guerra mundial. A população russa atingida consumiu alimentos produzidos a partir de grãos que não puderam ser colhidos durante o inverno. Os sintomas da doença, denominada Aléucia Tóxica Alimentar, foram: febre, angina necrótica, leucopenia, destruição da medula óssea seguidos de mortes. Posteriormente, atribuiu-se estes sintomas à presença de tricotecenos, pois eram semelhantes aos encontrados em estudos toxicológicos com estas micotoxinas (OSBORNE, 1982; SNYDER, 1986; UENO, 1983).

Levantamentos tem correlacionado a incidência destas micotoxinas com fatores climáticos, pois os tricotecenos parecem ocorrer preferencialmente em regiões onde períodos frios e úmidos são registrados. Por isso, os países mais preocupados com a contaminação de seus alimentos com tricotecenos são os Estados Unidos, Canadá, Japão e a Rússia (SCOTT, 1988).

Moniliformina

A moniliformina foi caracterizada estruturalmente como um sal de sódio ou potássio do 1-hidróxi-ciclobut-1-eno-3,4-diona ou um sal do ácido semi-esquárico (SPRINGER et alii, 1974) (Figura 3). A moniliformina foi descoberta por COLE et alii (1973) enquanto realizava a triagem de produtos tóxicos presentes em cultura de *F. moniliforme* Sheldon (*F. verticillioides* Nirenberg).

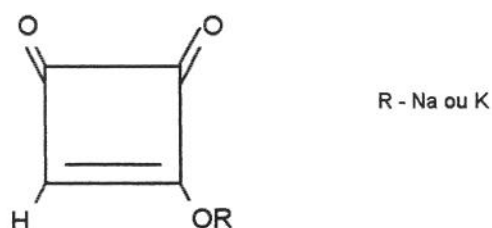


Figura 3 - Estrutura química da moniliformina.

A moniliformina é um metabólito produzido por várias espécies de *Fusarium*, entre elas: *F. moniliforme*, *F. subglutinans*, *F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. fusarioides* (*F. chlamydosporum*), *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. anthophilum*, *F. concolor*, *F. equiseti*, *F. semitectum*, *F. sporotrichioides*, e *F. culmorum* (CHELKOWSKI et alii, 1990; MARASAS et alii, 1979, 1984 e 1986; RABIE et alii, 1978 e 1982; SCOTT et alii, 1987).

A moniliformina é um composto tóxico para frangos, pintainhos e patinhos com dose letal 50 (DL₅₀) variando de 3,7 a 5,4 mg/kg por via oral (BURMEISTER et alii, 1979; KRIEK et alii, 1977), e 24 mg/kg intra-peritonealmente em camundongos (FARB et alii, 1976). Os efeitos tóxicos caracterizam-se por uma progressiva fraqueza muscular, dificuldade respiratória, cianose, coma, degeneração e necrose do miocárdio, e morte (KRIEK et alii, 1977).

Estes efeitos são decorrentes da semelhança química da moniliformina com o piruvato, onde esta age inibindo a enzima piruvato desidrogenase e a oxidação do α -cetoglutarato (GATHERCOLE et alii, 1986; HOFMEYER et alii, 1979; THIEL, 1978). O efeito de intoxicação crônica não é conhecido.

O primeiro relato da ocorrência natural de moniliformina foi em 1982, onde THIEL et alii (1982) ao analisar uma amostra de milho fungado colhida em 1978 da região de Transkei (África do Sul) detectaram a presença desta micotoxina. Os levantamentos realizados em diversas partes do mundo demonstraram que o milho eventualmente contém moniliformina (LEW et alii, 1996; RHEEDER et alii, 1995; SHARMAN et alii, 1991; THALMANN et alii, 1985).

Aflatoxinas

Quimicamente, as aflatoxinas pertencem ao grupo das furanocumarinas complexas (OMS, 1983) (Figura 1). As aflatoxinas B e G foram assim classificadas por apresentarem fluorescência azul ("blue") e verde ("green") quando observadas à luz ultra-violeta, respectivamente.

A aflatoxina B₁ é a mais tóxica seguida da G₁, B₂ e G₂. A forte habilidade de ligação da aflatoxina B₁ com o ácido desoxirribonucléico (DNA) é a principal causa de suas propriedades tóxicas e carcinogênicas (BAILEY, 1994). A aflatoxina B₁ além de ser a mais tóxica, é a de maior incidência, podendo provocar intoxicações agudas e crônicas.

As aflatoxinas são um grupo de micotoxinas produzidas por algumas cepas de *Aspergillus flavus* (SARGEANT et alii, 1961) e *A. parasiticus*. Outras espécies do gênero *Aspergillus* também são produtoras destas toxinas, como: *A. nomius*, *A. niger*, *A. wentii*, *A.*

ostianum, *A. fumigatus* e *A. frenesii*. Do gênero *Penicillium* há o *P. puberulum*, *P. citrinum*, *P. variable* e *P. frequentans* (WILSON & PAYNE, 1994; SCUSSEL, 1998).

Desde 1960, na Inglaterra, quando um surto de intoxicações matou cerca de cem mil filhotes de perus e milhares de outros filhotes de aves de hepatite aguda necrosante, devido a ingestão de ração à base de amendoim contaminado com aflatoxinas, as micotoxinas foram descobertas e várias aflatoxinas foram identificadas (B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , B_{2a} , G_{2a} , M_1 , M_2 , GM_1 , GM_2 , M_{2a} , GM_{2a} , B_3 , P_1 , Q_1 , aflatoxicol e diidroaflatoxicol) (ASAO et alii, 1963; EATON et alii, 1994; HEATHCOTE, 1984; NRIAGU & SIMMONS, 1990). Embora 17 compostos, todos designados aflatoxinas, tenham sido isolados, o termo aflatoxinas normalmente se refere aos 4 compostos B_1 , B_2 , G_1 e G_2 . O *A. parasiticus* produz as quatro toxinas, enquanto o *A. flavus* produz somente as aflatoxinas B_1 e B_2 (DIENER & DAVIS, 1987).

A toxicidade aguda das aflatoxinas caracteriza-se pelos danos hepáticos causado em aves e suínos. Caracteriza-se por ascite, degeneração hepática, proliferação do ducto biliar e necrose hepática (BUTLER, 1974; CULLEN & NEWBERNE, 1994; LOOSMORE & HARDING, 1961). A aflatoxina B_1 tem causado câncer hepático em diversos animais de laboratório: ratos (BUTLER, 1969; EPSTEIN et alii, 1969; SVOBODA et alii, 1966; WOGAN & NEWBERNE, 1967), macacos (ADAMSON et alii, 1973; GOPOLAN et alii, 1972; TILAK, 1975), patos (CARNAGHAN, 1965), peixes (SATO et alii, 1973; SINNHUBER et alii, 1968; SINNHUBER & WALES, 1974; WALES & SINNHUBER, 1972). A aflatoxina B_1 causa aberrações cromossômicas e rupturas de DNA em células vegetais e animais (ONG, 1975). No teste de Ames, a aflatoxina B_1 tem causado mutações em sistemas bacterianos após ativação com microsossomos hepáticos (WONG & HSIEH, 1976). ELIS & PAOLO (1967) observaram uma proporção elevada de fetos malformados, mortos e reabsorvidos em hamsters que receberam intraperitonealmente doses de 4 mg de aflatoxina B_1 /kg peso corpóreo (p.c.) no oitavo dia de gestação.

Estudos epidemiológicos conduzidos na África e Ásia revelaram que a aflatoxina B₁ é um hepatocarcinógeno humano (KRISHNAMACHARI et alii, 1975; PEERS et alii, 1976). O risco de câncer hepático previsto pela extrapolação de dados obtidos em ratos expostos a aflatoxina B₁ tem sido comparável com a incidência de câncer hepático observada na população humana. Nos Estados Unidos as predições baseadas nos dados em ratos superestimam a incidência de câncer hepático no homem. Isto pode estar relacionado com as diferenças metabólicas entre espécies e raças (GORELICK et alii, 1994).

Segundo JELINEK et alii (1989), as aflatoxinas ocorrem principalmente e em ordem decrescente em amendoim, milho e semente de algodão. Os dados obtidos nos levantamentos demonstraram que o milho eventualmente contém aflatoxinas. Portanto, se faz necessária a prevenção da contaminação através de alguns fatores (ZUBER & LILLEHOJ, 1979): (a) genótipos de milho resistentes à infecção pelo *A. flavus* ou *A. parasiticus* (McMILLIAN et alii, 1982; ZUBER et alii, 1983); (b) genótipos resistentes aos danos causados por insetos e uso de inseticidas e (c) práticas agrícolas para reduzir o estresse da seca incluindo a irrigação e a adequada fertilidade do solo.

Níveis máximos de aflatoxinas em alimentos e rações tem sido alvo de regulamentos em muitos países e este grupo de toxinas tem recebido maior atenção que qualquer outro devido ao fato de ter sido o mais estudado até agora e por ser um grupo dos mais tóxicos (Van EGMOND, 1995). No Brasil, a presença de aflatoxinas é regulada pela Resolução nº 34/76 do Ministério da Saúde, que estabelece o limite de 30 µg/kg para a soma das aflatoxinas B₁ e G₁, e pela Portaria nº 183 de 21 de Março de 1996, do Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária que estabelece o limite máximo de 20 µg/kg, para a somatória das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, acompanhando o que foi estabelecido para os países do Mercosul (BRASIL, 1977; BRASIL, 1996).

Ocratoxina A

As ocratoxinas são um grupo de compostos estruturalmente relacionados (ocratoxina A, B, C, α , éster metílico de ocratoxina A, éster metílico de ocratoxina B e éster etílico de ocratoxina B). A estrutura química da ocratoxina A (OA) contém 7-carbóxi-5-cloro-8-hidróxi-3,4-diidro-3R-metil-isocumarina ligada através do grupo carbóxi a β -fenilalanina (Figura 1). O único membro do grupo marcadamente tóxico é a ocratoxina A (OMS, 1983).

A OA é produzida por vários fungos, entre eles: *Aspergillus ochraceus* (sin. *A. alutaceus*), *Penicillium viridicatum*, *A. sulphureus* (SCOTT et alii, 1970), *A. melleus* (LAI et alii, 1970) e mais recentemente os fungos: *A. niger* var. *niger* (ABARCA et alii, 1994), *A. fumigatus*, *A. versicolor* e *A. alliaceus* (ABARCA et alii, 1997). CARLTON & KROGH (1979) concluíram que em regiões tropicais e subtropicais, o *A. ochraceus* é o mais importante produtor de OA. Enquanto nas regiões frias, particularmente, o Canadá, Dinamarca e Suécia, o *P. viridicatum* é a espécie predominante (STEYN, 1984).

A OA caracterizada, em 1965, por um grupo de pesquisadores da África do Sul, a partir de uma cepa de *A. ochraceus* (MERWE et alii, 1965). As ocratoxinas foram o primeiro grande grupo de micotoxinas identificadas após a descoberta das aflatoxinas (STEYN, 1984).

A OA é uma potente nefrotoxina e causa câncer em animais de laboratório e suínos. Os porcos já apresentam danos renais a níveis inferiores de 2 $\mu\text{g/g}$ de OA em ração e acima disto ocorre perda de peso (ELLING & MOLLER, 1973; KROGH, 1977). As aves são similarmente afetadas com reduzida taxa de crescimento e baixa produção de ovos a níveis superiores de 2 $\mu\text{g/g}$. No entanto, o gado é resistente aos níveis de OA encontrados em grãos naturalmente contaminados (PRELUSKY et alii, 1994). As lesões renais observadas são de degeneração tubular, fibrose intersticial e em fases posteriores, hialinização dos glomérulos com

diminuição da função tubular (KROGH et alii, 1976). O alvo secundário da OA é o fígado causando necrose do epitélio das células periportais hepáticas (MEISNER & CHAN, 1974).

A OA possui atividade teratogênica em ratos, camundongos e hamsters causando diversas malformações como: exencefalia, olhos abertos, costelas ondulantes, a não formação de vértebras, hidroencefalia, defeitos cardíacos e aumento da mortalidade pré-natal (HAYES et alii, 1974).

A OA é considerada um potente carcinógeno em ratos e camundongos (GODOY, 1985; KUIPER-GOODMAN & SCOTT, 1989). Em camundongos, dose de 40 µg de OA/kg, produziu adenomas renais e hepáticos em 30% dos animais avaliados. Em trutas, há formação de hepatomas. Contudo, não há indícios de mutagenicidade (OMS, 1983).

A “nefropatia endêmica dos Balcãs”, disfunção renal que afeta a população, está associada com a frequência e o nível elevado de OA nos alimentos na região da Bulgária, Iugoslávia e Romênia. Esta nefropatia caracteriza-se por progressiva redução da função renal e pode ser acompanhada de retenção de sódio, hipertensão e morte (CASTEGNARO et alii, 1987). A OA já foi detectada em 17% de amostras de sangue humano em áreas da Iugoslávia, com máxima de 50 ng/mL (HULT et alii, 1982).

A OA está parcialmente relacionada com câncer do trato urinário em áreas de exposição crônica em parte da Europa Oriental (CASTEGNARO et alii, 1991). Nos anos recentes, mais atenção tem sido dada a co-ocorrência de metabólitos do *Penicillium aurantiogriseum*, os quais induzem lesões renais similares a OA (MANTLE et alii, 1991). A IARC ao reavaliar a OA determinou que esta micotoxina é um possível carcinógeno para o homem (IARC, 1993).

Em 1969, a OA foi detectada pela primeira vez por SHOTWELL et alii (1969), em amostras de milho a níveis de 110 a 150 µg/kg. A OA é produzida principalmente após a colheita do milho (ABRAMSON et alii, 1992).

FUNGOS POTENCIALMENTE TOXIGÊNICOS EM MILHO

O milho, é constantemente exposto ao risco do desenvolvimento de fungos toxigênicos (ZUMMO & SCOTT, 1992). Inúmeras espécies de fungos associadas ao milho, principalmente dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, têm sido relatadas como produtoras de micotoxinas e como agentes responsáveis pelas micotoxicoses em animais domésticos e humanos (MILLER, 1995).

O milho está sujeito a contaminação por fungos toxigênicos quando há condições inadequadas de cultivo, colheita, transporte e estocagem (HENNIGEN & DICK, 1995). A contaminação por fungos e micotoxinas é um grande problema nos países em desenvolvimento e que apresentam clima tropical e subtropical. Esta contaminação é responsável por problemas de saúde no homem e em animais (SINHA, 1990).

Segundo CHRISTENSEN & KAUFMANN (1965) e CHRISTENSEN & SAUER (1982), os fungos que infectam os grãos de sementes, de maneira geral, podem ser classificados em dois grupos ecológicos, de acordo com o momento da contaminação e suas necessidades de água: os chamados “Fungos de Campo” e os “Fungos de Armazenamento”, necessitando para seu estabelecimento de umidade acima de 20% e entre 13-18%, respectivamente. Entretanto, ainda que o gênero *Fusarium* seja considerado “fungo de campo”, espécies do gênero são constantemente isoladas de milho armazenado (McLEAN & BERJAK, 1987). Fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, tidos como fungos de armazenamento, podem ocorrer antes da colheita e produzir micotoxinas (HILL et alii, 1985). Esta classificação apropriada para climas temperados não é adequada para climas quentes e úmidos, subtropical e tropical, onde os fungos

considerados “de armazenamento” freqüentemente aparecem durante o plantio e a colheita (WILSON & ABRAMSON, 1992).

MILLS (1989) cita as espécies de *Fusarium* como as principais invasoras de grão de milho no campo, causando, inclusive, várias doenças tais como podridão das sementes e colmos. Dentro do gênero *Fusarium*, as espécies fúngicas mais comuns são o *Fusarium moniliforme* e *F. subglutinans* (POZZI et alii, 1995; SUTTON, 1982).

A infecção do milho pelo *F. moniliforme* é complexa. Uma via seria através de hifas espessas provenientes da safra anterior as quais cairiam sobre as sementes expostas e a colonização ocorreria dentro da faixa adequada de temperatura e umidade (KOMMEDAHL & WINDELS, 1981). Outra via seria através dos esporos, provenientes da safra anterior, os quais contaminariam as sementes. Estas vias estão associadas com a doença da semente. Uma outra forma de infecção do milho com *F. moniliforme* ocorreria no estilo (barba) da espiga pelos conídios trazidos pelo vento, chuva ou insetos. Isto acontece em épocas de chuvas e depende do estágio de maturação que se encontra a espiga (MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997). Ainda outros fatores predispõem as espigas de milho à infecção pelo *F. moniliforme*: danos causados por outros fungos (SCHAAFSMA et alii, 1993), por insetos e pássaros (MILLER, 1994) e por granizo (LAZZARI & CAUS, 1997).

Além do *Fusarium*, outros fungos também são encontrados com muita frequência em milho, como é o caso do *Cephalosporium* spp. (TUIITE & FOSTER, 1979), *Aspergillus flavus* e *Penicillium oxalicum* (LILLEHOJ et alii, 1976), *Acremonium strictum* e *Penicillium* spp. (HESSELTINE et alii, 1976).

Segundo SMART et alii (1990), a via de infecção do *A. flavus* em milho ocorre em dois caminhos. No primeiro, o fungo pode crescer superficialmente e invadir a junção das

brácteas e atingir os grãos. Na segunda, o fungo cresce no interior da espiga e atinge os grãos. SMART et alii (1990) e PAYNE et alii (1988) demonstraram que a invasão de sementes não danificadas ocorre quando as plantas estão na fase tardia de maturação da espiga. Há também uma grande correlação entre *A. flavus* e danos causados por insetos, onde muitos destes são vetores do fungo (LEE et alii, 1980).

WILSON et alii (1981) verificaram que nos grãos de milho, os principais fatores que afetam o desenvolvimento fúngico são o conteúdo de umidade dos grãos, a temperatura, a umidade relativa do ambiente, o tempo de armazenamento, as condições dos grãos antes da colheita, a quantidade de inóculo presente no grão antes do armazenamento e a oxigenação. Outros fatores, como: pH do solo, composição de gases na atmosfera, interação com bactérias, outros fungos e artrópodes, agrotóxicos, irradiação, danos físicos e práticas agrícolas também podem influenciar o desenvolvimento de fungos em sementes de milho (BLANEY et alii, 1986; LACEY, 1988; WOOD & CARTER, 1989).

Resumindo, além dos fatores abióticos, os fungos toxigênicos podem infectar o milho das seguintes formas: (a) sendo um patógeno da planta, como o *Fusarium graminearum*; (b) o crescimento fúngico acontece e produz micotoxinas em situações de estresse da planta, como o *Aspergillus flavus* e o *Fusarium moniliforme*; (c) o fungo inicialmente coloniza a planta e predispõe o grão de milho a contaminação por micotoxinas após a colheita, como o *A. flavus*; (d) os fungos encontrados no solo ou de plantas que ocorrem no campo e proliferam se as condições de estocagem permitir, por exemplo o *Aspergillus ochraceus*; (e) o fungo está inteiramente ligado com a planta, havendo uma infecção sistêmica e com isso produzindo micotoxinas nos grãos de milho, como o *Fusarium moniliforme* (MILLER, 1994).

No Brasil, algumas espécies do gênero *Fusarium* já foram isoladas do milho e outros substratos procedentes de vários Estados brasileiros, com predominância das espécies *Fusarium moniliforme* e *Fusarium graminearum* (SALGADO & CARVALHO, 1980).

Analisando 90 amostras de milho armazenado em silos de várias regiões do Brasil, ASEVEDO et alii (1993) isolaram os seguintes gêneros: *Aspergillus* (72,2%), *Penicillium* (67,7%), *Fusarium* (62,2%), *Rhizopus* (7,7%), *Acremonium* (2,2%), *Chedosporium* (1,1%), além de fungos não esporulados (5,5%). Em um levantamento em vários tipos de grãos de milho submetidos a secagem logo após a colheita e provenientes de diferentes países, 92% das amostras provenientes do Brasil estavam contaminadas por *Fusarium* spp., 25% por *Penicillium* spp., 8% por *Aspergillus* spp., sendo, neste último, 4% por *A. niger* (LILLEHOJ & ZUBER, 1988). O gênero *Fusarium* foi o mais freqüente, seguido pelos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* em 195 amostras de três híbridos de milho recém-colhido e armazenado (ORSI et alii, 2000).

Das amostras de rações e milho utilizadas na alimentação de suínos do Estado de Santa Catarina, 90% estavam contaminadas por *Fusarium* sp., sendo que em alguns casos foi possível detectar zearalenona (WENTZ et alii, 1983).

POZZI et alii (1995), analisando 130 amostras de grãos de milho recém-colhido e armazenado, provenientes de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, verificaram uma maior frequência de *Fusarium* spp. (83,8%), seguido por *Penicillium* spp. (55,3%), *Aspergillus* spp. (40,7%) e outros 11 fungos filamentosos. Dentro do gênero *Fusarium*, a espécie predominante foi *Fusarium moniliforme* (80,7%), seguido pelo *F. proliferatum* (3,0%). Em relação ao gênero *Aspergillus*, a espécie predominante foi *A. flavus* (36,1%). A predominância de invasão por fungos dos gêneros *Fusarium* e *Penicillium*, em amostra de grãos de milho recém-colhido, provenientes de diferentes localidades do Estado de São Paulo foi também demonstrada por CASTRO et alii (1995).

ALMEIDA (1996), ao estudar 78 amostras de três híbridos de milho recém-colhido, provenientes de Assis, Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, Estado de São Paulo, encontrou o gênero *Fusarium* como o mais freqüente, seguido dos gêneros *Penicillium* e

Aspergillus. A espécie *F. moniliforme* foi a mais freqüente (53,8%) nas 4 regiões estudadas, seguida pelo *A. flavus* (17,9%) na totalidade das amostras.

Em amostras relacionadas com intoxicações em animais a predominância destes fungos tem sido registrada. Amostras de milho relacionadas com o quadro de leucoencefalomalácia em eqüinos (LEME), 49,4% das amostras estavam contaminadas por *F. moniliforme*, 25,8% por *Aspergillus* spp. e 25,8% por *Penicillium* spp. (XAVIER et alii, 1991). Em 38 amostras de grãos de milho envolvidos com surtos de LEME, foi encontrada uma contaminação de 97,4% de *Fusarium* spp., 57,9% por *Penicillium* spp. e 36,8% por *Aspergillus* spp. Dentro do gênero *Fusarium*, a espécie *F. moniliforme* (82%) foi a que prevaleceu (MEIRELLES et alii, 1994).

A constatação de fungos toxigênicos no milho não significa, automaticamente, a presença de micotoxinas no mesmo, principalmente se estes fungos não estiverem crescendo. Entretanto, indica que há, potencialmente, o risco de uma possível contaminação por micotoxinas (BULLERMAN, 1979). Relatos da presença de fungos toxigênicos em milho ressaltam a importância das toxinas de *Fusarium*, seguida das toxinas de *Aspergillus* e *Penicillium* em grãos de milho e derivados no Brasil.

OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM MILHO NO BRASIL

Dados sobre a contaminação de milho por micotoxinas no Brasil são escassos. Alguns relatos podem ser encontrados principalmente sobre aflatoxinas, zearalenona e ocratoxina A. SABINO et alii (1989) analisando 358 amostras de milho provenientes das regiões Sul e Sudeste verificaram que os níveis de ZEA variaram de não detectado (nd) a 9830 µg/kg. As amostras provenientes do Paraná, Santa Catarina (Sul) e Espírito Santo (Sudeste) não apresentavam-se contaminadas com ZEA. Entretanto, aquelas provenientes do Estado do Rio Grande do Sul e Minas Gerais apresentaram ZEA em 26,5% e 9,7%, respectivamente. Com

relação as aflatoxinas os autores encontraram 30 amostras positivas (18,2%) no milho proveniente do Sul (5 a 900 $\mu\text{g/kg}$ de aflatoxina B_1) e 14 (8,6%) no milho proveniente do Sudeste (5 a 148 $\mu\text{g/kg}$). O estudo não esclarece se o milho destinava-se ao consumo humano ou animal. Em outro levantamento realizado no Rio Grande do Sul, HENNIGEN & DICK (1995) não detectaram ZEA nas 23 amostras de milho estocado em silos. Encontraram, porém, aflatoxinas em 34,8% das amostras e a somatória de $B_1 + G_1$ variou de 12 a 906 $\mu\text{g/kg}$. Em 7 amostras de milho provenientes do Paraná ZEA também não foi detectada (MILANEZ et alii, 1998). Amostras de milho recém-colhido proveniente de 16 regiões do Estado de São Paulo foram analisadas para aflatoxinas, zearalenona e ocratoxina A com resultados negativos (CASTRO et alii, 1995). SANTÚRIO et alii (1992), analisando 238 amostras de milho de várias regiões do Sul, envolvidas na alimentação de suínos e aves, detectaram 28,9% das amostras contaminadas por aflatoxinas; 1,7% por OA e 4,8% das amostras por ZEA. O nível máximo de contaminação por aflatoxinas foi de 1906 $\mu\text{g/kg}$, de 745 $\mu\text{g/kg}$ para OA e de 4982 $\mu\text{g/kg}$ por ZEA.

POZZI et alii (1995) pesquisaram a ocorrência de micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona, esterigmatocistina, zearalenona, desoxinivalenol e fumonisina B_1) em 130 amostras de milho recém-colhidos e armazenados. Das amostras analisadas somente uma apresentou contaminação por aflatoxina B_1 (500 $\mu\text{g/kg}$).

GLÓRIA et alii (1997) analisaram 292 amostras de milho utilizado pela indústria alimentícia do Estado de São Paulo. A aflatoxina B_1 foi a mais frequente, tendo sido detectada em 57,3%, 16% e 27,2% das amostras da primeira, segunda e terceira amostragens, respectivamente. A contaminação média, considerando a somatória das aflatoxinas B_1 e G_1 , foi de 14,9 $\mu\text{g/Kg}$, 13,9 $\mu\text{g/Kg}$ e 4,3 $\mu\text{g/Kg}$, nestas referidas amostragens.

SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA (1989) verificaram a ocorrência de aflatoxinas, esterigmatocistina, OA e ZEA em diferentes tipos de produtos de milho (130 amostras de fubá, farinha, flocos pré-cozidos, canjica, sêmola, pipoca e milho verde enlatado).

Aflatoxinas foram encontradas em 5 amostras variando de 20 a 47 $\mu\text{g/kg}$ de B₁ e ocratoxina A em uma amostra (32 $\mu\text{g/kg}$). No levantamento realizado por SOARES & FURLANI (1992) em 227 amostras de milho para pipoca, não foram detectados OA e esterigmatocistina. ZEA foi encontrada em uma amostra (462 ng/g) e aflatoxinas em 15 amostras com teores de B₁ variando de 6 a 82 $\mu\text{g/kg}$.

Com relação a presença de tricotecenos em milho nacional apenas um trabalho pode ser encontrado na literatura até o presente. Milho proveniente de diferentes Estados (90 amostras) foi analisado para desoxinivalenol (DON) e toxina T-2 e 7 amostras continham DON de 125 a 542 ng/g e uma continha T-2 (104 ng/g) (PRADO et alii, 1997).

Fumonisinás começaram a ser pesquisadas em milho brasileiro no trabalho pioneiro realizado por MEIRELLES (1993) onde milho proveniente de rações envolvidas com casos de LEME foram analisadas semiquantitativamente e níveis de 10 a 500 $\mu\text{g/g}$ de FB₁ foram encontrados. Fumonisinás foram também encontradas em amostras de milho e de rações animais contendo milho (19 amostras) relacionadas com casos de LEME ou edema pulmonar em suínos no Estado do Paraná (SYDENHAM et alii, 1992). Amostras de milho do Paraná (39 amostras) e dos Estados de Mato Grosso e Goiás (9 amostras) continham todas fumonisinás em níveis de 0,6 a 18,52 $\mu\text{g/g}$ de FB₁ e de 1,2 a 19,13 $\mu\text{g/g}$ de FB₂ (HIROOKA et alii, 1996). ONO (1999) analisou 150 amostras de milho recém-colhido das safras 1995/1996 do Estado do Paraná. A FB₁ foi encontrada em 149 amostras a nível de 0,07 a 13,46 $\mu\text{g/g}$ e a FB₂ em 140 amostras com teores variando de 0,08 a 6,92 $\mu\text{g/g}$. ORSI et alii (2000) verificaram a ocorrência de fumonisinás em 195 amostras de milho recém-colhido e armazenado. A FB₁ foi encontrada em 176 amostras (90%) variando de 0,87 a 49,31 $\mu\text{g/g}$ e a FB₂ em 190 amostras (97,4%) variando de 1,96 a 29,16 $\mu\text{g/g}$. Estes resultados indicam a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a presença desta toxina em milho nacional.

Apenas um trabalho foi realizado até o momento pesquisando moniliformina em milho brasileiro. LEONI (1994) analisou milho recém-colhido proveniente de 18 regiões do Estado de São Paulo e quatro amostras de milho recém-colhido em estações experimentais do Instituto Agrônomo de Campinas e não detectou a toxina. Amostras de produtos de milho (fubá, milho para pipoca, milho para canjica, 68 amostras) foram também analisadas com resultados negativos.

COMENTÁRIOS FINAIS

A partir dos dados sobre a incidência de micotoxinas em milho, do conhecimento da ação tóxica das micotoxinas e do entendimento de produção destas pelos fungos se faz possível a tomada de estudos de medidas preventivas de forma a minimizar a exposição a estes contaminantes.

A presença de micotoxinas em milho e produtos alimentícios à base de milho relatadas na literatura científica reforçam a necessidade de um monitoramento destes contaminantes também em produtos nacionais para possivelmente estimar uma ingestão diária e assim avaliar possíveis riscos à saúde pela exposição às micotoxinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ABARCA, M.L., BRAGULAT, M.R., CASTELLÁ, G., ACCENSI, F., CABAÑES, F.J. New ochratoxigenic species in the genus *Aspergillus*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 12, p. 1580-1582, 1997.
02. ABARCA, M.L., BRAGULAT, M.R., CASTELLÁ, G., CABAÑES, F.J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 7, p. 2650-2652, July 1994.

03. ABBAS, H.K., OCAMB, C.M. First report of production of fumonisin B₁ by *Fusarium polyphialidicum* collected from seeds of *Pinus strobus*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, p. 642, 1995.
04. ABBAS, H.K., OCAMB, C.M., XIE, W., MIROCHA, C.J., SHIER, W.T. First report of fumonisin B₁, B₂, and B₃ production by *Fusarium oxysporum* var. *redolens*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, p. 968, 1995.
05. ABRAMSON, D., RICHTER, W., RINTELEN, J., SINHA, R.N., SCHUSTER, M. Ochratoxin A production in bavarian cereal grains stored a 15 and 19% moisture content. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 23, n. 2, p. 259-265, 1992.
06. ADAMSON, R.H., CORREA, P., DALGARD, D.W. Brief communication: Occurrence of a primary liver carcinoma in a rhesus monkey fed aflatoxin B₁. **Journal of National Cancer Institute**, Cary, v. 50, p. 549-551, 1973.
07. ALMEIDA, A.P. **Microbiota fúngica e produção de aflatoxinas e fumonisinas, por cepas de *Aspergillus flavus* Link e *Fusarium moniliforme* Sheldon, de três híbridos de grãos de milho recém-colhido**, São Paulo, 1996. (Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo).
08. ASAO, T., BÜCHI, G., ABDEL-KADER, M.M., CHANG, S.B., WICK, E.L., WOGAN, G.N. Aflatoxins B and G. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 85, p. 1706-1707, 1963.
09. ASEVEDO, I.G., GAMBALE, W., CORREA, B., PAULA, C.R., ALMEIDA, R.M.A. Influence of temperature and relative humidity in the production of aflatoxins in samples of stored maize, artificially contaminated with *Aspergillus flavus* Link. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 24, p. 32-37, 1993.
10. BAILEY, D.E., COX, G.E., MORGAREIDGE, K., TAYLOR, J. Acute and subacute toxicity of zearalenone in the rat. **TAP Roots**, Shreveport, v. 37, p. 144, 1976.
11. BAILEY, G.S. Role of aflatoxin DNA adducts in the cancer process. In: EATON, D.L., GROOPMAN, J.D. (eds.) **The Toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary, and agricultural significance**. San Diego: Academic Press Inc., 1994. pp. 137-148.
12. BENNETT, G.A., ANDERSON, R.A. Distribution of aflatoxin and/or zearalenone in wet-milled corn products: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 26, n. 5, p. 1055-1060, 1978.
13. BETINA, V. Zearalenone and brefeldin A. In: BETINA, V. ed. **Mycotoxins: production, isolation, separation and purification**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1984. pp. 237-257.

14. BEZUIDENHOUT, S.C., GELDERBLUM, W.C.A., GORST-ALLMAN, C.P., HORAK, R.M., MARASAS, W.F.O., SPITELLER, G., VLEGGAAR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society Chemical Communications**, Cambridge, v. 11, p. 743-745, 1988.
15. BHAVANISHANKAR, T.N., SHANTHA, T. Natural occurrence of *Fusarium* toxins in peanut, sorghum and maize from Mysore (India). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 40, n. 4, p. 327-332, 1987.
16. BLANEY, B.J., RAMSEY, M.D., TYLER, L. Mycotoxins and toxigenic fungi in insect-damaged maize harvested during 1983 in Far North Queensland. **Australian Journal of Scientific Research**, Collingwood, v. 35, p. 463-471, 1986.
17. BOTTALICO, A. On the occurrence of zearalenone. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 67, n. 2, p. 119-121, 1979.
18. BRASIL. Leis, decretos, etc. Ministério da Saúde. Resolução nº 34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília. Seção I, pt 1, p. 710. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos, 19 de janeiro de 1977.
19. BRASIL. Leis, decretos, etc. Ministério da Agricultura. Portaria nº 183, de 21 de março de 1996. **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 de março de 1996. Art. 1. Adotar Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho, aprovado pela Resolução do Grupo Mercado Comum do Sul nº 56/94, de 01 de janeiro de 1995.
20. BUCCI, T., HANSEN, D.K., LABORDE, J.B. Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin fumonisin B₁. **Natural Toxins**, New York, v. 4, n. 1, p. 51-52, 1996.
21. BULLERMAN, L.B. Occurrence of *Fusarium* and fumonisins on food grains and in foods. In: JACKSON, L.S., DEVRIES, J.W., BULLERMAN, L.B. (eds.) **Fumonisin in food**. New York: Plenum Press, 1996, pp. 27-38.
22. BULLERMAN, L.B. Significance of mycotoxins to food safety and human health. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 42, p. 65-86, 1979.
23. BULLERMAN, L.B.; TSAI, W.J. Incidence and levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn and corn-based foods and feeds. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 57, n. 6, p. 541-546, 1994.
24. BURGUESS, L.W., NELSON, P.E., TOUSSON, T.A. **Laboratory manual of a *Fusarium* studies**. Sydney: University of Sydney, 1981. 50 p.

25. BURMEISTER, H.R., CIEGLER, A., VESONDER, R.F. Moniliformin, a metabolite of *Fusarium moniliforme* NRRL 6322: purification and toxicity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 37, n. 1, p. 11-13, 1979.
26. BUTLER, W.H. Aflatoxicosis in laboratory animals. In: GOLDBLATT, L.A. (ed.) **Aflatoxin: Scientific background, control and implications**. New York: Academic Press, 1969. pp. 223-236.
27. BUTLER, W.H. Aflatoxin. In: PURCHASE, I.F.H. (ed.) **Mycotoxins**. Amsterdam: Elsevier, 1974. pp. 1-28.
28. CARLTON, W.W., KROGH, P. Ochratoxins. A review. **Food Drug Admin. Bureau Vet. Med.**, p. 165-287, 1979. Apud: BETINA, V. (ed) **Mycotoxins: Production, isolation, separation and purification**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1984. 528 p.
29. CARNAGHAN, R.B.A. Hepatic tumours in ducks fed on low level of toxic groundnut meal. **Nature**, London, v. 208, p. 308, 1965.
30. CASTEGNARO, M., BARTSCH, H., CHERNOZEMSKY, I. Endemic nephropathy and urinary tract tumors in the Balkans. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 47, p. 3608-3609, 1987.
31. CASTEGNARO, M., PLESTINA, R., DIRHEIMER, G., CHERNOZEMSKY, I.N., BARTSCH, H. (eds.) **Mycotoxin, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours**. Lyon: IARC Scientific Publication, 1991. n. 115. 340 p.
32. CASTRO, M.F.P.M., SOARES, L.M.V., FURLANI, R.R.Z. Mycoflora, aflatoxigenic species and mycotoxins in freshly harvested corn (*Zea mays* L.): a preliminary study. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 289-295, 1995.
33. CAWOOD, M.E., GELDERBLOM, W.C.A., VLEGGAAR, R., BEHREND, Y., THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O. Isolation of the fumonisin mycotoxins - a quantitative approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, n. 11, p. 1958-1962, 1991.
34. CHELKOWSKI, J., ZAWADZKI, M., ZAJKOWSKI, P., LOGRIECO, A., BOTTALICO, A. Moniliformin production by *Fusarium* species. **Mycotoxin Research**, Mainz, v. 6, n. 1, p. 41-45, 1990.
35. CHEN, J., MIROCHA, C.J., XIE, W., HOGGLE, L., OLSON, D. Production of the mycotoxin fumonisin B₁ by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 12, p. 3928-3931, Dec. 1992.
36. CHRISTENSEN, C.M., KAUFMANN, H.H. Deterioration of stored grains by fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 3, p. 69-84, 1965.

37. CHRISTENSEN, C.M., SAUER, D.B. Mycoflora. In: CHRISTENSEN, C.M. (ed.) **Storage of cereal grains and their products**. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1982. pp. 219-240.
38. CHU, F.S., LI, G.Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidence of esophageal cancer. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 3, p. 847-852, Mar. 1994.
39. COLE, R.J., KIRKSEY, J.W., CUTLER, H.G., DOUBNIK, B.L., PECKHAM, J.C. Toxin from *Fusarium moniliforme*: effects on plants and animals. **Science**, Washington, v. 179, p. 1324-1326, 1973.
40. COLVIN, B.M., HARRISON, L.R. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, n. 1-2, p. 79-82, 1992.
41. CULLEN, J.M., NEWBERNE, P.M. Acute hepatotoxicity of aflatoxins. In: EATON, D.L., GROOPMAN, J.D. (eds.) **The Toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary, and agricultural significance**. San Diego: Academic Press Inc., 1994. pp. 3-26.
42. DIENER, U.L., DAVIS, N.D. Biology of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. In: ZUBER, M.S., LILLEHOJ, E.B., RENFRO, B.L. (eds.) **Aflatoxin in maize: A proceedings of the workshop**. Mexico: CIMMYT, 1987, pp. 33-40.
43. DOKO, M.B., CANET, C., BROWN, N., SYDENHAM, E.W., MPUCHANE, S., SIAME, B.A. Natural co-occurrence of fumonisins and zearalenone in cereals and cereal-based foods from Eastern and Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 10, p. 3240-3243, 1996.
44. DOKO, M.B., VISCONTI, A. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 11, n. 4, p. 433-439, 1994.
45. DUARTE, A.D., PATERNIANI, M.E.A.G.Z. Cultivares de milho no Estado de São Paulo. **Documentos IAC**. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, n. 62, 1998. 81 p.
46. EATON, D.L., RAMSDELL, H.S., NEAL, G.E. Biotransformation of aflatoxins. In: EATON, D.L., GROOPMAN, J.D. (eds.) **The Toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary, and agricultural significance**. San Diego: Academic Press Inc., 1994. pp. 45-72.
47. ELIS, J., PAOLO, J.A. Aflatoxin B₁. **Archives of Pathology**, Washington, v. 83, p. 53-57, 1967.

48. ELLING, F., MOLLER, T. Mycotoxic nephropathy in pigs. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 49, p. 411-418, 1973.
49. EPPLEY, R.M. Trichothecenes and their analysis. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 56, p. 824-829, 1979.
50. EPPLEY, R.M., STOLOFF, L., TRUCKSESS, M.W., CHUNG, C.W. Survey of corn for *Fusarium* toxins. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 57, p. 632-635, 1974.
51. EPSTEIN, S.M., BARTUS, B., FARBER, E. Renal epithelial neoplasms induced in male Wistar rats by oral aflatoxin B₁. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 29, p. 1045-1050, 1969.
52. FANCELLI, A.L. Tecnologia da Produção. In: **Milho - produção, pré-processamento e transformação agroindustrial**. São Paulo: Secretaria da Agricultura e Comércio, Ciência e Tecnologia, 1983. p. 1-68 (Série 5).
53. FAO, FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. **Worldwide regulations for mycotoxins 1995. A compendium. Food and Nutrition paper**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, paper 64, 1997.
54. FARB, R.M., MEGO, J.L., HAYES, A.W. Effect of mycotoxins on uptake and degradation of [¹²⁵I] albumin in mouse liver and kidney lysosomes. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, London, v. 1, n. 6, p. 985-990, 1976.
55. GATHERCOLE, P.S., THIEL, P.G., HOFMEYER, H.S. Inhibition of pyruvate dehydrogenase complex by moniliformin. **Biochemical Journal**, London, v. 233, p. 719-723, 1986.
56. GELDERBLUM, W.C.A., JASKIEWICZ, K., MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G., HORAK, R.M., VLEGGARR, R., KRIEK, N.P.J. Fumonisin - novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 7, p. 1806-1811, July 1988.
57. GELDERBLUM, W.C.A., KRIEK, N.P.J., MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁, in rats. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 12, n. 7, p. 1247-1251, 1991.
58. GELDERBLUM, W.C.A., SEMPLE, E., MARASAS, W.F.O., FARBER, E. The cancer-initiating potential of the fumonisin B mycotoxins. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 13, n. 3, p. 433-437, 1992.
59. GLÓRIA, E.M., FONSECA, H., SOUZA, I.M. Occurrence of mycotoxins in maize delivered to the food industry in Brazil. **Tropical Science**, Oxford, v. 37, p. 107-110, 1997.

60. GODOY, K. Micotoxinas cancerígenas em alimentos. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, Buenos Aires, v. 4, p. 43-44, 1985.
61. GOLDBLATT, L.A. Mycotoxins - past, present and future... **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 54, p. 302A-310A, 1977.
62. GOPOLAN, C., TULPULE, P.G., KRISHNAMURTHI, D. Induction of hepatic carcinoma with aflatoxin in the rhesus monkey. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 10, p. 519-521, 1972.
63. GORELICK, N.J., BRUCE, R.D., HOSEYNI, M.S. Human risk assessment based on animal data: Inconsistencies and alternatives. In: EATON, D.L., GROOPMAN, J.D. (eds.) **The Toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary, and agricultural significance**. San Diego: Academic Press Inc., 1994. pp. 493-512.
64. HARRISON, L.R., COLVIN, B.M., GREENE, J.T., NEWMAN, L.E., COLE, J.R. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Turlock, v. 2, n. 3, p. 217-221, 1990.
65. HAYES, A.W., HOOD, R.D., LEE, H.L. Teratogenic effects of ochratoxin A in mice. **Teratology**, New York, v. 9, p. 93-98, 1974.
66. HEATHCOTE, J.G. Aflatoxins and related toxins. In: BETINA, V. (ed.) **Mycotoxins: production, isolation, separation and purification**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1984. pp.89-130.
67. HENNIGEN, M.R., DICK, T. Incidence and abundance of mycotoxins in maize in Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 12, n. 5, p. 677-681, 1995.
68. HESSELTINE, C.W., SHOTWELL, O.L., KWOLEK, K.F., LILLEHOJ, E.B., JACKSON, W.K., BOTHAST, R.J. Aflatoxin occurrence in 1973 corn at harvest II. Mycological studies. **Mycologia**, New York, v. 68, p. 341-353, 1976.
69. HILL, R.A., WILSON, P.M., McMILLIAN, W.W., WIDSTRÖM, N.W., COLE, R.J., SANDERS, T.H., BLANKENSHIPP, P.P. Ecology of *Aspergillus flavus* group and aflatoxin formation in maize and groundnut. In: LACEY, S. (ed.) **Trichothecenes and other mycotoxins**. Chichester: John Wiley and Sons, 1985. p. 79-86.
70. HIROOKA, E.Y., YAMAGUCHI, M.M., AOYAMA, S., SUGIURA, Y., UENO, Y. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 2, p. 173-183, Feb-Mar. 1996.

71. HOFMEYER, J.H.S., Van MERWE, K.J., SWART, P., THIEL, P.G. **South African Journal of Science**, Pretoria, v. 75, p. 469, 1979. Apud: GATHERCOLE, P.S., THIEL, P.G., HOFMEYER, H.S. Inhibition of pyruvate dehydrogenase complex by moniliformin. **Biochemical Journal**, London, v. 233, p. 719-723, 1986.
72. HOLMBERG, T., PETERSON, H. Toxin production by *Fusarium* species isolated from Swedish-grown cereals. **Swedish Journal of Agricultural Research**, Uppsala, v. 16, n. 4, p. 183-185, 1986.
73. HSU, I.C., SMALLEY, E.B., STRONG, F.M., RIBELIN, W.E. Identification of T-2 toxins in moldy corn associated with a lethal toxicosis in dairy cattle. **Applied Microbiology**, Washington, v. 24, p. 684-690, 1972.
74. HULT, K., PLESTINA, R., HABAZIN-NOVAK, V., RADIC, B., CEOVIC, S. Ochratoxin A in human blood and Balkan Endemic Nephropathy. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 51, p. 313-321, 1982.
75. HUSSEIN, H.M., FRANICH, R.A., BAXTER, M., ANDREW, I.G. Naturally occurring *Fusarium* toxins in New Zealand maize. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 6, n. 1, p. 49-58, 1989.
76. IARC, Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, vol 56, Lyon: IARC, 1993.
77. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. (<http://www.sidra.ibge.gov.br/cgi-bin/prtabl>), 29/11/99.
78. ISHII, K., SAWANO, M., UENO, Y., TSUNODE, H. Distribution of zearalenone-producing *Fusarium* species in Japan. **Applied Microbiology**, Washington, v. 27, p. 625-628, 1974.
79. JACKSON, L.S., HLYWKA, J.J., SENTHIL, K.R., BULLERMAN, L.B. Effect of thermal processing on the stability of fumonisins. In: JACKSON, L.S., DEVRIES, J.W., BULLERMAN, L.B. eds. **Fumonisins in food**. New York: Plenum Press, 1996, pp. 345-353.
80. JELINEK, C.F., POHLAND, A.E., WOOD, E.E. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds. An update. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 72, n. 2, p. 223-230, 1989.
81. KELLERMAN, T.S., MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G., GELDERBLUM, W.C.A., CAWOOD, M.E., COETZER, J.A.W. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B₁. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Onderstepoort, v. 57, n. 4, p. 269-275, 1990.

82. KOMMEDAHL, T., WINDELS, C.E. Root-, stalk-, and ear-infecting *Fusarium* species on corn in the USA. In: NELSON, P.E., TOUSSOUN, T.A., COOK, R.J. (eds.) ***Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy***. Pennsylvania: University Park, 1981. pp. 94-103.
83. KRIEK, N.P.J., MARASAS, W.F.O., STEYN, P.S., van RENSBURG, S.J., STEYN, M. Toxicity of a moniliformin-producing strain of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* isolated from maize. ***Food and Cosmetics Toxicology***, Oxford, v. 15, p. 579-587, 1977.
84. KRISHNAMACHARI, K.A.V.R., BHAT, R.V., NAGARAJAN, V., TILAK, T.B.G. Hepatitis due to aflatoxicosis. ***Lancet***, Boston, v. 1, p. 1061, 1975.
85. KROGH, P. Ochratoxin A residues in tissues of slaughter pigs with nephropathy. ***Nordisk Veterinær Medicin***, Vanlose, v. 29, p. 402-405, 1977.
86. KROGH, P., ELLING, F., GYRD-HANSEN, H., HALD, B., LARSEN, A.E., LILLEHOJ, E.B., MADSEN, A., MORTENSEN, H.P., RAVNSKOV, U. Experimental porcine nephropathy: Changes of renal function and structure perorally induced by crystalline ochratoxin A. ***Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica***, Copenhagen, v. 84, p. 429-434, 1976.
87. KUIPER-GOODMAN, T., SCOTT, P.M. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. ***Biomedical and Environmental Sciences***, Beijing, v. 2, p. 179-248, 1989.
88. KUIPER-GOODMAN, T., SCOTT, P.M., WATANABE, H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. ***Regulatory Toxicology and Pharmacology***, Orlando, v. 7, n. 3, p. 253-306, 1987.
89. LACEY, J. The microbiology of cereal grains from areas of Iran with a high oesophageal cancer. ***Journal of Stored Products Research***, Kidlington, v. 24, n. 1, p. 39-50, 1988.
90. LAI, M., SEMENIUK, G., HESSELTINE, C.W. Conditions for production of ochratoxin A by *Aspergillus* species in a synthetic medium. ***Applied Microbiology***, Washington, v. 19, p. 542-544, 1970.
91. LAUREN, D.R., AGNEW, M.P., SMITH, W.A., SAYER, S.T. A survey of the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in cereals grown in New Zealand in 1986-1989. ***Food Additives and Contaminants***, London, v. 8, n. 5, p. 599-605, 1991.
92. LAZZARI, F.A., CAUS, S. ***Replatio de milho e soja***. Curitiba: Paranaset Gráfica e Editora Ltda, 1997. 54 p.
93. LEE, L.S., LILLEHOJ, E.B., KWOLEK, W.F. Aflatoxin distribution in individual corn kernels from intact ears. ***Cereal Chemistry***, St. Paul, v. 57, p. 340-343, 1980.

94. LEONI, L.A.B. **Moniliformina em milho: Um estudo de metodologia analítica e de incidência**, Campinas, 1994. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas).
95. LEW, H., CHELKOWSKI, J., PRONCZUK, P., EDINGER, W. Occurrence of the mycotoxin moniliformin in maize (*Zea mays* L.) ears infected by *Fusarium subglutinans* (Wollenw. & Reinking) Nelson *et al.* **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 3, p. 321-324, 1996.
96. LILLEHOJ, E.B., FENNEL, D.I., KWOLEK, K.F. *Aspergillus flavus* and aflatoxin in Iowa corn before harvest. **Science**, Washington, p. 495-496, 1976.
97. LILLEHOJ, E.B., ZUBER, M.S. Distribution of toxin producing fungi in maize kernels from diverse environments. **Tropical Science**, London, v. 28, n. 1, p. 19-24, 1988.
98. LOOSMORE, R.M., HARDING, J.D.J. A toxic factor in Brazilian groundnut causing liver damage in pigs. **Veterinary Record**, London, v. 73, p. 1362-1364, 1961.
99. L'VOVA, L.S., ORLOVA, N.Y., BYSTRYAKOVA, Z.K., OMEL'CHENKO, M.D., REMELE, V.V. Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in various crop grains. **Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya**, Moscow, v. 29, n. 1, p. 70-79, Jan-Feb. 1993.
100. MANTLE, P.G., McHUGH, K.M., ADATIA, R., HEATON, J.M., GRAY, T., TURNER, D.R. *Penicillium auranteogriseum* induced persistent renal histopathological changes in rats: an experimental model for Balkan endemic nephropathy competitive with ochratoxin A. In: CASTEGNARO, M., PLESTINA, R., DIRHEIMER, G., CHERNOZEMSKY, I.N., BARTSCH, H. (eds.) **Mycotoxin, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours**. Lyon: IARC Scientific Publication, 1991. n. 115. pp. 119-130.
101. MARASAS, W.F.O., KRIEK, N.P.J., STEYN, P.S., Van RENSBURG, S.S., Van SCHALKWYK, D.J. Mycotoxicological investigations on Zambian maize. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 16, p. 39-45, 1978.
102. MARASAS, W.F.O., KRIEK, N.P.J., WIGGINS, V.M., STEYN, P.S., TOWERS, D.K., HASTIE, T.J. Incidence, geographic distribution and toxigenicity of *Fusarium* species in South African corn. **Phytopathology**, St. Paul, v. 69, p. 1181-1185, 1979.
103. MARASAS, W.F.O., NELSON, P.E., TOUSSOUN, T.A. **Toxigenic *Fusarium* species: Identity and Mycotoxicology**. Pennsylvania: The Pennsylvania State University Press, 1984.

104. MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G., RABIE, C.J., NELSON, P.E., TOUSSOUN, T.A. Moniliformin production in *Fusarium* section *Liseola*. **Mycologia**, New York, v. 78, p. 242-247, 1986.
105. McLEAN, M., BERJAK, P. Maize grain and then associated mycoflora - a microbiological consideration. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 15, p. 831-850, 1987.
106. McMILLIAN, W.W., WIDSTRÖM, N.W., WILSON, D.M. Aflatoxin production on various popcorn genotypes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 74, p. 156-157, Jan-Feb. 1982.
107. McNUTT, S.H., PURWIN, P., MURRAY, C. Vulvovaginitis in swine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 73, p. 484-492, 1928.
108. MEIRELLES, M.C.A. **Leucoencefalomalácia eqüina no Brasil, aspectos epizootiológicos, microbiológicos e toxicológicos**, São Paulo, 1993. (Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo).
109. MEIRELLES, M.C.A., CORRÊA, B., FISCHMAN, O., GAMBALE, W., PAULA, C.R., CHACON-RECHE, N.O., POZZI, C.R. Mycoflora of the toxic feeds associated with equine leucoencephalomalacia (ELEM) outbreaks in Brazil. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 127, p. 183-188, 1994.
110. MEISNER, H., CHAN, S. Ochratoxin A, an inhibitor of mitochondrial transport systems. **Biochemistry**, Washington, v. 13, p. 2795-2800, 1974.
111. MERWE, K.J., Van STEYNE, P.S., FOURIE, L., SCOTT, B., THERON, J.J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, London, v. 205, p. 1112-1113, 1965.
112. MILANEZ, T.V., ATUI, M.B., LÁZZARI, F.A. Comparação entre imunoensaio e cromatografia em camada delgada na determinação de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em amostras de milho em grão e fubá. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 57, n. 1, p. 65-71, 1998.
113. MILLER, J.D. Epidemiology of *Fusarium* ear diseases. In: MILLER, J.D., TRENHOLM, H.L. (ed.) **Mycotoxins in Grain**. St. Paul: Eagan Press, 1994. pp. 19-36.
114. MILLER, J.D. Fungi and Mycotoxins in Grain: Implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research**, Kidlington, v. 31, n. 1, p. 1-16, 1995.
115. MILLER, J.K., HACKING, A., GROSS, V.J. Stillbirds, neonatal mortality and small litters in pigs associated with the ingestion of *Fusarium* toxin by pregnant sows. **Veterinary Record**, London, v. 93, p. 555-559, 1973.

116. MILLS, J.T. Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* species on cereal seeds. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 52, p. 737-742, 1989.
117. MIROCHA, C.J. Historical aspects of mycotoxicology and developments in aflatoxicosis. **Proceeding of the International Symposium on Mycotoxins**, Cairo, p. 23-31, 1983.
118. MIROCHA, C.J., CHRISTENSEN, C.M. Oestrogenic mycotoxins synthesized by *Fusarium*. In: PURCHASE, I.F.H. (ed.) **Mycotoxins**, Amsterdam: Elsevier Press, 1974. pp. 129-148.
119. MUNKVOLD, G.P., DESJARDINS, A.E. Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n. 6, p. 556-565, June 1997.
120. MURPHY, P.A., HENDRICH, S., HOPMANS, E.C., HAUCK, C.C., LU, Z., BUSEMAN, G., MUNKVOLD, G. Effect of processing on fumonisin content of corn. In: JACKSON, L.S., DEVRIES, J.W., BULLERMAN, L.B. (eds.) **Fumonisin in food**. New York: Plenum Press, 1996. pp. 323-334.
121. MUSSER, S.M., PLATTNER, R.D. Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium nygamai*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, n. 4, p. 1169-1173, 1997.
122. NELSON, P.E. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, n. 1-2, p. 29-36, 1992.
123. NELSON, P.E., PLATTNER, D.D., SHACKELFORD, D.D., DESJARDINS, A.E. Fumonisin B₁ production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 3, p. 984-989, 1992.
124. NOGUEIRA Jr., S., NOGUEIRA, E.A., TSUNECHIRO, A. **Considerações sobre a agroindústria do milho**. São Paulo: Instituto de Economia Agrícola, 1987. v. 27, p. 1-18 (Relatório de Pesquisa).
125. NRIAGU, J.O., SIMMONS, M.S. **Food contamination from environmental sources**. New York: Academic Press, 1990. 613 p.
126. OMS, ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. **Criterios de salud ambiental 11, Micotoxinas**. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1983. 133 p.
127. ONG, T.M. Aflatoxin mutagenesis. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 32, p. 35-53, 1975.
128. ONO, E.Y.S. **Microbiota fúngica, fumonisinas e efeito de armazenagem em milho**, Londrina, 1999 (Tese de Doutorado – Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina).

129. ORSI, R.B., CORREA, B., POZZI, C.R., SCHAMMAS, A.E., 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**, Kidlington, v. 36, p. 75-87, 2000.
130. OSBORNE, B.G. Mycotoxins and the cereal industry: a review. **Journal of Food Technology**, Oxford, v. 17, p. 1-9, 1982.
131. PALOMINO, M.E.T., FONSECA, H., OETTERER, M. Contaminação e distribuição de aflatoxinas nos produtos e subprodutos do processamento via seca e via úmida do milho. **Boletim da SBCTA**, Campinas, v. 31, n. 1, p. 77-86, Jan-Jun. 1997.
132. PARK, J.J., SMALLEY, E.B., CHU, F.S. Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in field samples from the 1992 Wiscotin corn crop. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 5, p. 1642-1648, May 1996.
133. PASTER, N., BLUMENTHAL-YONASSI, J., BARKAI-GOLAN, R., MENASHEROV, M. Production of zearalenone in vitro and in corn grains stored under modified atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 12, n. 2-3, p. 157-165, 1991.
134. PAYNE, G.A., THOMPSON, D.L., LILLEHOJ, E.B., ZUBER, M.S., ADKINS, C.R. Effect of temperature on the preharvest infection of maize kernels by *Aspergillus flavus*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 10, p. 1376-1380, 1988.
135. PEDROSA, A.V.B.; DEZEN, R.B. O milho: características do mercado e perspectivas. **Preços Agrícolas**, São Paulo, v. 55, p. 1-4, 1991.
136. PEERS, F.G., GILMAN, G.A., LINSELL, C.A. Dietary aflatoxins and human liver cancer. A study in Swaziland. **International Journal of Cancer**, New York, v. 17, p. 167-176, 1976.
137. POZZI, C.R., CORREA, B., GAMBALE, W., PAULA, C.R., CHACON-RECHE, N.O., MEIRELLES, M.C.A. Post-harvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxins occurrence. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 12, n. 3, p. 313-319, 1995.
138. PRADO, G., OLIVEIRA, M.S., FERREIRA, S.O., CORRÊA, T.B.S., AFFONSO, B.R.R. Ocorrência natural de desoxinivalenol e toxina T-2 em milho pós-colheita. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 259-262, 1997.
139. PRELUSKY, D.B., ROTTER, B.A., ROTTER, R.G. Toxicology of mycotoxins. In: MILLER, J.D., TRENHOLM, H. (eds.) **Mycotoxins in grain**. Saint Paul: Eagan Press, 1994, pp. 329-358.

140. RABIE, C.J., LÜBBEN, A., LOUW, A.I., RATHBONE, E.B., STEYN, P.S., VLEGGAAR, R. Moniliformin, a mycotoxin from *Fusarium fusarioides*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 26, p. 375-379, 1978.
141. RABIE, C.J., MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G., LÜBBEN, A., VLEGGAAR, R. Moniliformin production and toxicity of different *Fusarium* species from southern Africa. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 43, n. 3, p. 517-521, Mar. 1982.
142. RESNIK, S., NEIRA, S., PACIN, A., MARTINEZ, E., APRO, N., LATREITE, S. A survey of the natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in Argentine field maize: 1983-1994. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 1, p. 115-120, 1996.
143. RHEEDER, J.P., MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G., SYDENHAM, E.W., SHEPHARD, G.S., van SCHALKWYK, D.J. *Fusarium moniliforme* and the fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, p. 353-357, 1992.
144. RHEEDER, J.P.; SYDENHAM, W.E.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; SHEPHARD, G.S.; SCHLECHTER, M.; STOCKENSTRÖM, S.; CRONJE, D.W.; VILJOEN, J.H. Fungal infestation and mycotoxin contamination of South African commercial maize harvested in 1989 and 1990. **South African Journal of Science**, Pretoria, v. 91, p. 127-131, Mar. 1995.
145. RILEY, R.T., NORRED, W.P., BACON, C.W. Fungal toxins in foods: recent concerns. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 13, p. 167-189, 1993.
146. ROSS, P.F., NELSON, P.E., RICHARD, J.L., OSWEILLER, G.D., RICE, L.G., PLATTNER, R.D., WILSON, T.M. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leucoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 10, p. 3225-3226, 1990.
147. SABINO, M. Micotoxinas em alimentos. In: OGA, S. (ed.) **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu Editora, 1996, pp. 461-472.
148. SABINO, M., PRADO, G., INOMATA, E.I., PEDROSO, M.O., GARCIA, R.V. Natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in maize in Brazil. Part II. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 6, n. 3, p. 327-331, 1989.
149. SALGADO, J.M., CARVALHO, P.C.T. Fungos toxigênicos associados a cereais. I - Levantamento da microbiota do milho, trigo e arroz. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 11, n. 2, p. 60-63, 1980.

150. SANTÚRIO, J.M., BALDISSERA, M.A., ALMEIDA, C.A.A., AHMAD, S.H.C., PRANKE, P.H.L., HEINRICHS, C.M., ZANANDREA, S. Aflatoxins, ocratoxina A e zearalenona em grãos e rações destinados aos consumo animal no Sul do Brasil. **Anais do VII Encontro Nacional de Micotoxinas**, São Paulo, 1992, p. 14.
151. SARGEANT, K., O'KELLY, J., CARNAGHAN, R.B.A., ALLCROFT, R. The assay of a toxic principle in certain groundnut meals. **Veterinary Record**, London, v. 73, p. 1219-1223, 1961.
152. SATO, S., MATSUSHIMA, T., TANAKA, N., SUGIMURA, T., TAKASHIMA, F. Hepatic tumors in the guppy (*Lebistes reticulatus*) induced by aflatoxin B₁, dimethylnitrosamine, and 2-acetylaminofluorene. **Journal of the National Cancer Institute**, Cary, v. 50, p. 765-778, 1973.
153. SCHAAFSMA, A.W., MILLER, J.D., SAVARD, M.E., ERWING, R. Ear rot development and mycotoxin production in corn in relation to inoculation method and corn hybrid for three species of *Fusarium*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 15, p. 185-192, 1993.
154. SCOTT, P.M. Multi-year monitoring of Canadian grains and grain-based foods for trichothecenes and zearalenone. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 14, n. 4, p. 333-339, 1997.
155. SCOTT, P.M. Mycotoxins. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 71, n. 1, p. 70-76, 1988.
156. SCOTT, P.M., ABBAS, H.K., MIROCHA, C.J., LAWRENCE, G.A., WEBER, D. Formation of moniliformin by *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium culmorum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 1, p. 196-197, Jan. 1987.
157. SCOTT, P.M., LAWRENCE, J.W., Van WALBEEK, W. Detection of mycotoxins by thin-layer chromatography: application to screening of fungal extracts. **Applied Microbiology**, Washington, v. 20, p. 839-842, 1970.
158. SCUSSEL, V.M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Editora Insular, 1998. 144 p.
159. SEO, J.A., LEE, Y.W. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 3, p. 1331-1334, Mar. 1999.
160. SETTI, T. Industrialização do milho no Brasil. In: Congresso Nacional do milho e sorgo, 19, Porto Alegre, 1992. **Conferências**. Porto Alegre, SAA, 1992. p. 176-85.

161. SHARMAN, M., GILBERT, J., CHELKOWSKI, J. A survey of the occurrence of the mycotoxin moniliformin in cereal samples from sources worldwide. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 8, n. 4, p. 459-466, 1991.
162. SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; STOCKENSTRÖM, S.; SYDENHAM, E.W. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 79, n.3, p. 671-687, 1996.
163. SHOTWELL, O.L., HESSELTINE, C.W., GOULDEN, M.L. Ochratoxin A: occurrence as natural contaminant of a corn sample. **Applied Microbiology**, Washington, v. 17, n. 5, p. 765-766, May 1969.
164. SHOTWELL, O.L., HESSELTINE, C.W., VANDEGRAFT, E.E., GOULDEN, M.L. Survey of corn from different regions for aflatoxin, ochratoxin, and zearalenone. **Cereal Science Today**, St. Paul, v. 16, p. 266-273, 1971.
165. SINHA, K.K. Incidence of mycotoxins in maize grains in Bihar State, India. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 7, n. 1, p. 55-61, 1990.
166. SINNHUBER, R.O., WALES, J.H. Aflatoxin B₁ hepatocarcinogenicity in rainbow trout embryos. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 33, p. 247, 1974.
167. SINNHUBER, R.O., WALES, J.H., AYRES, J.L., ENGEBRECHT, R.H., AMEND, D.L. Dietary factors and hepatoma in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) I. Aflatoxins in vegetable protein feedstuffs. **Journal of the National Cancer Institute**, Cary, v. 41, p. 711-718, 1968.
168. SMART, M.G., WICKLOW, D.T., CALDWELL, R.W. Pathogenesis in *Aspergillus* ear rot of maize: light microscopy of fungal spread from wounds. **Phytopathology**, St. Paul, v. 80, n. 12, p. 1287-1294, 1990.
169. SMITH, J.E., MOSS, M.O. **Mycotoxins: formation, analysis and significance**. Chichester: John Wiley and Sons, 1985. 148 p.
170. SNYDER, A.P. Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecenes mycotoxins. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 49, n. 7, p. 544-569, July 1986.
171. SOARES, L.M.V., FURLANI, R.P.Z. Micotoxinas em milho para pipoca. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1/2, p. 33-36, 1992.
172. SOARES, L.M.V., RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-

layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.

173. SPEERS, G.M., MERONUK, R.A., BARNES, D.M., MIROCHA, C.J. Effect of feeding *Fusarium roseum* f. sp. *graminearum* contaminated corn and the mycotoxin F-2 on the growing chick and laying hen. **Poultry Science**, Savoy, v. 50, p. 627-633, 1971.
174. SPRINGER, J.P., CLARDY, J., COLE, R.J., KIRKSEY, J.W., HILL, R.K., CARLSON, R.M., ISIDOR, J.L. Structure and synthesis of moniliformin, a novel cyclobutane microbial toxin. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 96, n. 7, p. 2267-2268, Apr. 1974.
175. STEYN, P.S. Ochratoxins and related dihydroisocoumarins. In: BETINA, V. (ed.) **Mycotoxins: Production, isolation, separation and purification**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1984. pp. 183-216.
176. SUTTON, J.C. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 4, p. 195-209, 1982.
177. SVOBODA, D., GRADY, H.J., HIGGINSON, J. Aflatoxin B₁ injury in rat and monkey liver. **American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 49, p. 1023-1051, 1966.
178. SYDENHAM, E.C., MARASAS, W.F.O., SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., HIROOKA, E.Y. Fumonisin concentrations in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, n. 6, p. 994-997, June 1992.
179. SYDENHAM, E.W., SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O., STOCKENSTRÖM, S. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, n. 11, p. 2014-2018, 1991.
180. SYDENHAM, E.W., STOCKENSTRÖM, S., THIEL, P.G., SHEPHARD, G.S., KOCH, K.R., MARASAS, W.F.O. Potential of alkaline hydrolysis for the removal of fumonisins from contaminated corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 5, p. 1198-1201, 1995.
181. TANAKA, T., HASEGAWA, A., YAMAMOTO, S., LEE, U.S., SUGIURA, Y., UENO, Y. Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 36, n. 5, p. 979-983, 1988.
182. THALMANN, A., MATZENAUER, S., GRUBER-SCHLEY, S. Survey on the occurrence of fusariotoxins in cereals. **Bericht ueber Landwirtschaft**, Muenster, v. 63, p. 257-272, 1985.

183. THIEL, P.G. A molecular mechanism for the toxic action of moniliformin, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*. **Biochemical Pharmacology**, Tarrytown, v. 27, p. 483-486, 1978.
184. THIEL, P.G., MEYER, C.J., MARASAS, W.F.O. Natural occurrence of moniliformin together with deoxynivalenol and zearalenone in Transkeian corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 30, n. 2, p. 308-312, 1982.
185. TILAK, T.B. Induction of cholangiocarcinoma following treatment of a rhesus monkey with aflatoxin. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 13, p. 247-249, 1975.
186. TUIITE, J., FOSTER, G.H. Control of storage diseases of grain. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 17, p. 343-360, 1979.
187. UENO, Y. Mode of action of trichothecenes. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 49, p. 1737-1745, 1977.
188. UENO, Y. Trichothecenes: chemical, biological and toxicological aspects. In: UENO, Y. (ed.) **Developments in Food Science**. Tokyo: Elsevier Press, 1983, v. 4. 326 p.
189. UENO, Y. Trichothecenes as environmental toxicants. In: HODGSON, E. (ed.) **Reviews in Environmental Toxicology**. Amsterdam: Elsevier Press, 1986, cap. 2.
190. UENO, Y., NAKAJIMA, M., SAKAI, K., ISHII, K., SATO, N., SHIMADA, N. Comparative toxicology of trichothecenes mycotoxins: Inhibition of protein synthesis of animal cells. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 74, p. 285-296, 1973.
191. Van EGMOND, H.P. Mycotoxins: regulations, quality assurance and reference materials. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 12, n. 3, p. 328-330, 1995.
192. WALES, J.H., SINNHUBER, R.O. Hepatomas induced by aflatoxin in the sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). **Journal of the National Cancer Institute**, Cary, v. 48, p. 1529-1530, 1972.
193. WENTZ, I., SILVEIRA, P.R.S., SOBESTIANSKY, J., SANTOS, C.R.M., REES, U. Fusariotoxicoses e estrogenismo em suínos. **Comunicação Técnica CNPSA/EMBRAPA**, v. 34, p. 1-3, Ago. 1983.
194. WILSON, D.M., ABRAMSON, D. Mycotoxins. In: SAUER, D.B. (ed.) **Storage of cereal grains and their products**. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1992. pp. 341-391.
195. WILSON, D.M., PAYNE, G.A. Factors affecting *Aspergillus flavus* group infection and aflatoxin contamination of crops. In: EATON, D.L., GROOPMAN, J.D. (eds.) **The**

Toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary, and agricultural significance.
San Diego: Academic Press Inc., 1994. pp. 233-258.

196. WILSON, T.M., NELSON, P.E., TOUSOUN, T.A., MARASAS, W.F.O. The *Fusarium* research center and proposed diagnostic, reference and research center of *Fusarium* mycotoxicoses in animals. **Proceedings of Annual Meeting. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians**, Tucson, v. 24, p. 261-276, 1981.
197. WOGAN, G.N., NEWBERNE, P.M. Dose-response characteristics of aflatoxin B₁ carcinogenesis in the rat. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 27, p. 2370-2376, 1967.
198. WOOD, G.D., CARTER, L. Jr. Limited survey of deoxynivalenol in wheat and corn in United States. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 72, n. 1, p. 38-40, 1989.
199. WONG, J.J., HSIEH, D.P.H. Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and carcinogenic potential. **Proceedings of the National Academy of Science**, Allahabad, v. 73, p. 2241-2244, 1976.
200. XAVIER, J.G., BRUNNER, C.H.M., SAKAMOTO, M., CORRÊA, B., FERNANDES, W.E., DIAS, J.L.C. Equine leukoencephalomalacia: Report of five cases. **Brazilian Journal of Animal Science**, Viçosa, v. 28, p. 185-189, 1991.
201. YAMASHITA, A., YOSHIZAWA, T., AIURA, U., SANCHEZ, P.C., DIZON, E.I., ARIM, R.H., SARDHJONO *Fusarium* mycotoxins (Fumonisin, nivalenol, and zearalenone) and aflatoxins in corn from Southeast Asia. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 59, n. 9, p. 1804-1807, 1995.
202. ZUBER, M.S., DARRAH, L.L., LILLEHOJ, E.B., JOSEPHSON, L.M., MANWILLER, A., SCOTT, G.E., GUDAUSKAS, R.T., HORNER, E.S., WIDSTRÖM, N.W., THOMPSON, D.L., BOCKHOLT, A.J., BREWBAKER, J.L. Comparison of open-pollinated maize varieties and hybrids for preharvest aflatoxin contamination in the Southern United States. **Plant Disease**, St. Paul, v. 67, n. 2, p. 185-187, Feb. 1983.
203. ZUBER, M.S., LILLEHOJ, E.B. Status of the aflatoxin problem in corn. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 8, n. 1, p. 1-5, Jan-Mar. 1979.
204. ZUMMO, N., SCOTT, G.E. Interaction of *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus flavus* on Kernel infection and aflatoxin contamination in maize ears. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, p. 771-773, 1992.

1.2. FUMONISINAS: ASPECTOS ANALÍTICOS

RESUMO

As fumonisinas, micotoxinas presentes em alimentos e rações, principalmente no milho, são produzidas por espécies do gênero *Fusarium*. Foi demonstrado experimentalmente que a fumonisina B₁ causa a leucoencefalomalácia eqüina (LEME), edema pulmonar em suínos (EPS) e câncer hepático em ratos, além de ser provável agente responsável por câncer de esôfago em humanos, como demonstram os estudos epidemiológicos realizados na África do Sul e na China. Com a finalidade de fornecer informações a respeito dos métodos empregados na determinação de fumonisinas em alimentos e rações, foi realizada uma revisão da metodologia analítica relatada na literatura científica.

Unitermos: Fumonisinas, Métodos analíticos, Alimentos, Rações.

INTRODUÇÃO

A fumonisina B₁ (FB₁) foi isolada e purificada por GELDERBLOM et alii (1988) de culturas de *Fusarium moniliforme* e caracterizada estruturalmente por BEZUIDENHOUT et alii (1988) (Figura 2). A FB₁ tem demonstrado causar câncer hepático em ratos (GELDERBLOM et alii, 1991), leucoencefalomalácia em equinos (LEME) (ROSS et alii, 1993), edema pulmonar em suínos (COLVIN & HARRISON, 1992) e está associada com câncer de esôfago em humanos (THIEL et alii, 1992). Os efeitos tóxicos sugerem a necessidade de controlar a presença de fumonisinas em alimentos e rações.

O conhecimento dos níveis de fumonisinas em produtos naturalmente contaminados por estas micotoxinas só pode ser observado através de métodos analíticos adequados. Tais métodos são necessários para a fiscalização, monitoramento e pesquisa nos seus vários aspectos, seja análise de alimentos e rações, estudos epidemiológicos, estudo da produção de fumonisinas e do metabolismo dos fungos, verificação da estabilidade durante o processamento de alimentos e condições para descontaminação (SCOTT, 1993).

As etapas envolvidas no procedimento analítico para a detecção de fumonisinas são: extração, purificação, detecção, quantificação e confirmação (Tabela 1).

Esta revisão resume as informações sobre a metodologia analítica para a determinação de fumonisinas.

Tabela 1 - Etapas envolvidas no procedimento analítico de fumonisinas.

Etapas	Descrição
1. Extração	solventes agitação filtração e/ou centrifugação fluido supercrítico
2. Limpeza	cromatografia de troca iônica cromatografia de fase reversa cromatografia de imunoafinidade
3. Detecção/Quantificação	cromatografia em camada delgada cromatografia em camada delgada de alta eficiência cromatografia líquida de alta eficiência - detector por absorvância no ultra-violeta - detector de fluorescência - detector de massas cromatografia gasosa - detector de ionização de chama - detector de massas eletroforese capilar imunoensaaios - ELISA - fibra óptica
4. Confirmação	derivação química espectrometria de massas imunoensaaios

EXTRAÇÃO

As fumonisinas são compostos fortemente polares, solúveis em água, bastante solúveis em acetonitrila-água e muito solúveis em metanol, mas não são solúveis em solventes não polares (SCOTT, 1993).

A extração de fumonisinas de amostras de milho, rações, arroz, leite, meios de cultura ou outras, requer o uso de solventes ou mistura destes (Tabela 2). A combinação de metanol-água (3:1-v/v) é a mais utilizada. Outras proporções (v/v) também empregadas são: 3:2, 1:1, 1:3 e 4:1 (Tabela 2). A mistura acetonitrila-água (1:1-v/v) tem apresentado boa recuperação de fumonisinas presentes em amostras naturalmente contaminadas (BENNETT & RICHARD,

1994; RICE et alii, 1995; ROSS et alii, 1991). RICE et alii (1995) observaram que acetonitrila-água (1:1-v/v) forneceu uma melhor recuperação para as fumonisinas B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) e B₃ (FB₃) em um curto tempo de agitação (30 minutos) e que extratos límpidos são obtidos com o uso de acetonitrila e metanol, enquanto são necessários métodos de clarificação (por exemplo, a centrifugação) quando a água é usada como solvente extrator.

A etapa de extração de fumonisinas requer um adequado estudo, devendo-se observar os fatores que podem alterar a recuperação do método. ALBERTS et alii (1992) e SCOTT & LAWRENCE (1994) observaram o efeito do pH durante a extração de fumonisinas em meios de cultura, milho e seus derivados. ALBERTS et alii (1992) demonstraram uma recuperação 17% maior de FB₁ em uma extração com pH 3,5 usando metanol-água (3:1-v/v) do que em pH 6. Esta última, 30% maior do que em pH 8 e 19% maior do que em pH 2. Enquanto, SCOTT & LAWRENCE (1994) observaram que o uso de tampão borato pH 9,2 melhorou a recuperação de FB₁ e FB₂ em farelo de milho. Portanto, verifica-se que a natureza da matriz é outro fator importante.

Para a extração de fumonisinas em milho são necessários longos períodos de agitação (15 a 60 minutos) ou o uso de potentes agitadores, como o *Polytron mixer* (2 a 5 minutos) (SYDENHAM et alii, 1992). A filtração e a centrifugação auxiliam a próxima etapa que é a limpeza da amostra.

SELIM et alii (1996) desenvolveram e otimizaram um método de extração para fumonisina B₁ em milho utilizando fluido supercrítico. O método é rápido, eficiente e preciso, além de reduzir o uso e a exposição a solventes orgânicos. O uso de 15 mL de CO₂ líquido, ácido acético como modificador em uma concentração de 5 % e em um volume de 750 µL por grama de amostra, 1200 *psi* de pressão e vinte minutos de extração estática foram as condições ótimas para a extração da fumonisina B₁ em milho contaminado.

Tabela 2 - Levantamento de métodos para extração de fumonisinas em diversos substratos.

Substratos analisados	Fumonisin	Solventes	Tempo de agitação (min)	Filtração (Whatman n°)	Centrifugação	Referências
Milho e seus produtos derivados	FB1, FB2	metanol-água (3:1)	5-30	4	500 g/10' - 4°C	03, 35, 36, 52, 55, 57, 70, 71
	FB1, FB2, FB3	metanol-água (3:1)	2-3	1		45, 58, 59
	FB1	metanol-água (3:1)	3-30	2		61, 75
	FB1	metanol-água (4:1)	60	4		68
	HFB1		3	4		44
	FB1, FB2	metanol-tampão borato pH 9,2 (3:1)	5	4		46
	FB1, FB2	metanol-água-HCl 5N (3:1:0,3)	5	4		46
	FB1, FB2	NaCl/metanol-água (4:1)	2	4		69, 76
	FB1, FB2	metanol-HCl 0,1M (3:1)	5		4000g/10'-4°C	23
	HFB1	metanol-acetonitrila-água (1:1:2)		4		44
	FB1, FB2, FB3, HFB1	acetonitrila-água (1:1)	30-60	4	15000 rpm/15'	08, 20, 33, 35, 36, 39, 51
	FB1, FB2, FB3	água	30-60	4		36
Rações a base de milho	FB1, FB2	acetato de etila / metanol-água (3:1)	30	4		34
	FB1	acetonitrila-água (1:1)	20-60	4		19, 38
	FB1, FB2, FB3	metanol-água (3:1)	2-30	4	500 g/10' - 4°C	58
Leite	FB1, FB2, FB3	água	30-60	4		36
	FB1, FB2	metanol-acetona (1:1)	10		10000 rpm/10' - 20°C	28
	FB1, FB2	acetonitrila-água (1:1)	10		10000 rpm/10' - 20°C	28
Arroz	FB1	metanol-água (3:1)	3	4		14
Cultura de fungos	FB1, FB2	acetato de etila/metanol-água (3:1)	30-60	4		09, 10, 15
	FB1, FB2, FB3	metanol-água (3:1)	5	4	500 g/10' - 4°C	04, 05, 36, 57
	FB1	metanol-água (3:2)	30-60	4		72
	FB1, FB2, FB3	metanol-água (1:3) e (1:1)	30-60	4		04
	FB1, FB2	clorofórmio-metanol (1:1)	2	4		74
	FB1, FB2, FB3	água	30-60	4		04
	FB1, FB2, FB3	metanol	30-60	4		04
	FB1, FB2	acetonitrila-água (1:1)			2000 rpm/5'	04
Plasma e urina	FB1	metanol				53

Obs.: HFB1 - hidrolizado de fumonisina B1.

LIMPEZA

A etapa de limpeza na análise de fumonisinas é necessária para remover os compostos interferentes que são co-extraídos com os solventes. Os procedimentos de limpeza do extrato envolvem a partição líquido-líquido, colunas de extração com fase sólida e mais recentemente o uso de colunas de imunoafinidade (SCOTT, 1993) (Tabela 3).

Segundo WARE et alii (1993), o procedimento de limpeza utilizando coluna de fase reversa C_{18} é rápido, eficiente e preciso. Os interferentes polares são removidos da amostra pela lavagem com metanol-água (1:3-v/v), (1:1-v/v) ou KCl 1%-acetonitrila (9:1-v/v). De acordo com ALBERTS et alii (1992) a perda de fumonisinas, principalmente a FB_1 , é grande quando usa-se metanol-água (1:1-v/v) ao invés de metanol-água (1:3-v/v). Segundo WARE et alii (1993) para a remoção de interferentes não polares usa-se o acetato de etila-acetona (1:1-v/v) e a FB_1 é eficientemente eluída da coluna quando utiliza-se clorofórmio-metanol-ácido acético (60:40:10-v/v/v). A eluição das fumonisinas de colunas C_{18} é geralmente realizada com metanol-água (3:1-v/v) (ALBERTS et alii, 1992; ALBERTS et alii, 1990; CAWOOD et alii, 1991; GELDERBLOM et alii, 1988; SYDENHAM et alii, 1990a) ou acetonitrila-água (7:3-v/v) (HOLCOMB et alii, 1993a e b; HOPMANS & MURPHY, 1993; RICE & ROSS, 1994; RICE et alii, 1995; ROSS et alii, 1991; ROTTINGHAUS et alii, 1992; SHELBY et alii, 1994). Quando empregaram acetonitrila-água (7:3-v/v) para a eluição das fumonisinas, WILSON et alii (1990) preconizaram lavar a coluna com acetonitrila-KCl 1% (1:9-v/v) para remover os interferentes de matriz e permitir que as fumonisinas fossem quantitativamente eluídas. RICE et alii (1995) mostraram que o fator crítico na etapa de limpeza com C_{18} é a própria coluna, pois há diferença na recuperação das fumonisinas entre marcas diferentes e até mesmo em diferenças de lotes de fabricação da mesma marca.

TABELA 3 - Principais técnicas de limpeza dos extratos obtidos nas análises de fumonisinas.

Técnicas de limpeza	Descrição	Referências
Colunas de Extração de Fase Sólida		
- Fase reversa C ₁₈	metanol-água (1:1) → metanol-água (3:1)	10, 15
	metanol-água (1:3) → metanol-água (3:1)	04, 05, 57
	acetonitrila-água (2:8) → acetonitrila-água (7:3)	20, 38
	KCl 1% → acetonitrila-KCl 1% (1:9) → acetonitrila-água (7:3)	18, 19, 35, 36, 39, 51, 77
	metanol-água (1:3) → acetona-acetato de etila (1:1) → clorofórmio-metanol-ácido acético (60:40:10)	08, 75
- Troca aniônica forte (TAF)	metanol-água (3:1) → metanol → metanol-ácido acético (0,5 a 5%)	14, 19, 23, 28, 45, 46, 52, 53, 55, 58, 62, 65, 67, 71
- Combinações	fase reversa C ₁₈ → troca aniônica forte (TAF)	19, 44
Colunas de Imunoafinidade	NaCl 2,5%-NaHCO ₃ 0,5%-Tween 20 0,01% → água → Na ₂ B ₄ O ₇ 0,05M em água-metanol (1:4)	76
	NaCl 2,5%-NaHCO ₃ 0,5%-Tween 20 0,01% → água → metanol-água (4:1)	69
	NaCl 2,5%-NaHCO ₃ 0,5%-Tween 20 0,01% → água → metanol	43

A coluna de troca aniônica forte (TAF) foi primeiramente utilizada por SHEPHARD et alii (1990) na análise de fumonisinas e é a mais citada na literatura (AKIYAMA et alii, 1995; DAWLATANA et alii, 1995; HOLCOMB et alii, 1993b; LUKACS et alii, 1996; MARAGOS & RICHARD, 1994; SCOTT & LAWRENCE, 1992 e 1994; SHEPHARD et alii, 1992; STACK & EPLEY, 1992; SYDENHAM et alii, 1990b e 1992; THAKUR & SMITH, 1996; VELÁZQUEZ et alii, 1995). Na cromatografia por troca iônica a fase estacionária é altamente carregada, sendo que os solutos com cargas de sinais contrários a esta são seletivamente adsorvidos da fase móvel. Os solutos adsorvidos podem ser subsequentelemente eluídos por deslocamento com outros íons com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária. Apesar deste princípio ser simples, o mecanismo de separação de troca iônica pode ser complexo. Vários fatores como pH, força iônica e fluxo de eluição podem afetar a retenção ou eluição das fumonisinas (DAWLATANA et alii, 1995; SYDENHAM et alii, 1992; THIEL et alii, 1993). Baixas recuperações podem ser obtidas se o fluxo de eluição for maior que 1 mL/min ou o pH do extrato for menor que 5,8 (SYDENHAM et alii, 1992; THIEL et alii, 1993). DAWLATANA et alii (1995) obtiveram uma melhor

recuperação em pH 6,2 para extratos de arroz. SYDENHAM et alii (1992) indicaram que o uso de solvente com maior força iônica (metanol-ácido acético 1%) reduz o volume de eluato sem co-eluir compostos intrínsecos do milho que interferem com a determinação cromatográfica de fumonisinas. As colunas TAF podem ser regeneradas e reutilizadas para a etapa de limpeza das amostras sem perda na recuperação das fumonisinas (SYDENHAM et alii, 1992).

BENNETT & RICHARD (1994) recomendaram o uso de colunas C₁₈ ou TAF para a etapa de limpeza. Entretanto, deve-se testar a recuperação devido às grandes variações observadas em diferentes lotes de colunas C₁₈. Os autores também verificaram que as colunas TAF são mais eficientes na eliminação de compostos interferentes dos extratos e os extratos são mais límpidos, mas deve-se eluir as fumonisinas lentamente (<1 mL/min) e o pH do extrato deve estar entre 6 e 7.

A limpeza com ambas colunas C₁₈ e TAF foi realizada por HOLCOMB et alii (1993b) para diminuir os altos picos da linha de base na cromatografia líquida de alta eficiência. A presença destes picos aumenta o ruído e diminui a sensibilidade do método.

A cromatografia de imunoafinidade mostra-se apropriada para a etapa de limpeza em amostras (HANSEN et alii, 1993). WARE et alii (1994) avaliaram a capacidade, seletividade, reprodutibilidade deste tipo de colunas e concluíram que estas colunas são excelentes para a etapa de purificação de fumonisinas em milho e outros seus derivados. As variações coluna-coluna e entre cada lote não foram significativamente diferentes. A curva é linear de 0,1 a 1,0 µg para FB₁ e FB₂. A curva indicou saturação dos sítios de ligação da coluna acima de 1,0 µg de FB₁ e FB₂. Interferentes de matriz têm pouca influência na eficiência da ligação da FB₁ e FB₂ na coluna. Estas fumonisinas possuem afinidade semelhante pela coluna, portanto, o anticorpo não distingue as duas moléculas. A capacidade da coluna desenvolvida por MARAGOS et alii (1997) foi superior às colunas disponíveis comercialmente, sendo de 6 µg para as fumonisinas intactas (FB₁, FB₂ e FB₃) e 2,5 µg para hidrolizados de fumonisinas (HFB₁). TRUCKSESS et alii (1995)

observaram que o metanol afeta a ligação antígeno-anticorpo e indicaram o uso de metanol-água (4:1-v/v) ao invés do metanol para a eluição da FB₁ em colunas de imunoafinidade.

SCOTT & TRUCKSSES (1997) apresentaram as vantagens das colunas de imunoafinidades, como: especificidade (eliminação da maioria dos interferentes do extrato e ainda permite baixos limites de detecção), velocidade, baixo uso de solventes, possibilidade de automação e reutilização da coluna. Mas a principal desvantagem é o custo, além da pouca disponibilidade no comércio e a ocasional necessidade de limpeza com outras colunas antes do uso da coluna de imunoafinidade.

SYDENHAM et alii (1996b) recomendam, quando possível, o uso de material de referência certificado para avaliar a qualidade de cada grupo ou lote de adsorvente.

A etapa final na preparação de amostra para análise de fumonisinas é a redução do volume por evaporação do solvente em rotaevaporador sob pressão reduzida ou banho aquecido sob fluxo de nitrogênio. A amostra seca será redissolvida em um volume conhecido de solvente ou sofrerá reação de derivação para ser usada na etapa de detecção/quantificação.

DETECÇÃO/QUANTIFICAÇÃO

A determinação de fumonisinas em amostras de alimentos e cultura de fungos tem sido realizada principalmente através de técnicas cromatográficas (Tabela 1).

Cromatografia em camada delgada e cromatografia em camada delgada de alta eficiência

A análise de fumonisinas por cromatografia em camada delgada (CCD) ou cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) pode ser realizada em fase normal (ACKERMANN, 1991; CAWOOD et alii, 1991; DAWLATANA et alii, 1995; JACKSON & BENNETT, 1990; PLATTNER et alii, 1990; ROSS et alii, 1991; SYDENHAM et alii, 1990a; VOSS et alii, 1990) ou fase reversa (ACKERMANN, 1991; GELDERBLOM et alii, 1988; ROTTINGHAUS et alii, 1992; SHELBY et alii, 1994; VESONDER et alii, 1990) (Tabela 4).

TABELA 4 - Valores de Rf das fumonisinas para diferentes sistemas-solventes e agentes cromogênicos ou de intensificação de fluorescência usados em CCD/CCDAE de fase normal ou reversa.

Sistema-solvente	Rf	Fase estacionária	Reveladores	Referências
metanol-água (3:1)	FB1 - 0,44 a 0,55 FB2 - 0,22	reversa C ₁₈	p-anisaldeído 0,5% (púrpura)	15, 72
metanol-água (80:20)	FB1 - 0,61 FB2 - 0,47	reversa C ₁₈	p-anisaldeído 0,5%	01
metanol-KCl 4% (3:2)	FB1 - 0,50 FB2 - 0,10	reversa C ₁₈	fluorescamina (fluorescência amarelo - esverdeada)	39, 51
clorofórmio-metanol-ácido acético (6:3:1)	FB1 - 0,15 a 0,30 FB2 - 0,20 a 0,30 FB3 - 0,26 FB4 - 0,31	sílica gel 60 G	p-anisaldeído 0,5% ou ninidrina 0,2%	10, 21, 34, 38, 57, 74 10
clorofórmio-metanol-ácido acético (7:2:1)	FB1 - 0,20	sílica gel 60 G	p-anisaldeído 0,17%	14
clorofórmio-metanol-ácido acético (60:35:10)	FB1 - 0,32 FB2 - 0,52	sílica gel 60 G	p-anisaldeído 0,5%	01
clorofórmio-metanol-água-ácido acético (55:36:8:1)	FB1 - 0,23 FB2 - 0,30 FB3 - 0,30 FB4 - 0,37	sílica gel 60 G	p-anisaldeído 0,5% ou ninidrina 0,2%	10

O método desenvolvido por GELDERBLOM et alii (1988) para a detecção de fumonisinas utiliza metanol-água (3:1-v/v) como sistema-solvente, placas de fase reversa e p-anisaldeído como agente cromogênico, mas possui um baixo limite de detecção (10 µg/g). ROTTINGHAUS et alii (1992) utilizaram o cloreto de potássio na fase móvel e a fluorescamina

como agente intensificador de fluorescência para aumentar a sensibilidade (0,1 µg/g) e a especificidade.

JACKSON & BENNETT (1990) utilizaram a CCDAE para resolver a separação das fumonisinas devido à dificuldade em separar as FB₁, FB₂ e FB₃. WILSON et alii (1990) citam que deve-se remover a água do extrato (acetonitrila-água, 1:1-v/v) antes do desenvolvimento cromatográfico em fase normal, o que não é necessário quando usa-se a cromatografia em fase reversa.

Outros métodos, além da CCD, têm sido desenvolvidos, permitindo uma melhor exatidão na quantificação do teor de fumonisinas em amostras, mas a CCD continua sendo uma importante técnica de confirmação (NORRED, 1993; ROTTINGHAUS et alii, 1992).

Cromatografia gasosa

Os procedimentos de cromatografia gasosa (CG) capilar na determinação de amostras contaminadas por fumonisinas são precedidos pela hidrólise alcalina (BEZUIDENHOUT et alii, 1988; JACKSON & BENNETT, 1990; PLATTNER et alii, 1990; SYDENHAM et alii, 1990b; VESONDER et alii, 1990; VOSS et alii, 1990) ou ácida (SYDENHAM et alii, 1990a) de seus extratos, seguidos pela esterificação com isobutanol e anidrido heptafluorobutírico do ácido tricarbálico (SYDENHAM et alii, 1990a) e/ou acilação com trimetilsilil ou trifluoroacetato das moléculas dos aminopolióis (aminopentol e aminotetraol originados das FB₁ e FB₂, respectivamente) (BEZUIDENHOUT et alii, 1988; JACKSON & BENNETT, 1990; PLATTNER et alii, 1990; SYDENHAM et alii, 1990b; VESONDER et alii, 1990; VOSS et alii, 1990). Os derivados são bem separados por CG capilar (coluna DB-5, filme de 0,25 µm, 30 a 60 m de comprimento) e detectados por ionização de chama ou espectrometria de massas.

Os procedimentos acima possuem a vantagem de facilitar a combinação da CG com a espectrometria de massas, cuja finalidade é a confirmação do resultado (THIEL et alii, 1992). A cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas possui seletividade e especificidade, mas perde em sensibilidade e requer equipamentos sofisticados e de custo elevado, além de não ser prática para análise de grande número de amostras (SYDENHAM et alii, 1992).

Cromatografia líquida de alta eficiência

Como as fumonisinas são solúveis em água, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) predomina entre as demais técnicas utilizadas para a detecção e quantificação destas micotoxinas. O uso de colunas de fase reversa (C_8 ou C_{18}) com diferentes fases móveis é amplamente citado na literatura científica, conforme mostra a Tabela 5.

As fumonisinas têm sido separadas por eluição isocrática ou gradiente. Na eluição isocrática utiliza-se a mistura metanol-tampão fosfato 0,05 a 0,1 M pH 3,3 a 3,8 em diferentes proporções (v/v ou v/v/v) 80:20 (MEREDITH et alii, 1996; ROSS et alii, 1991; SHEPHARD et alii, 1990), 70:30 (ALBERTS et alii, 1990; CAWOOD et alii, 1991; GELDERBLOM et alii, 1988; SYDENHAM et alii, 1990a), 68:32 (SYDENHAM et alii, 1992) e 66:34 (SHEPHARD et alii, 1992; TEJADA-SIMON et alii, 1995), ou as combinações acetonitrila-água-ácido acético (v/v/v) na proporção 50:50:1 (STACK & EPPLEY, 1992; TRUCKSESS et alii, 1995), 55:45:1 (WARE et alii, 1993) e 60:40:1 (BENNETT & RICHARD, 1994; WARE et alii, 1994) e acetonitrila-tampão fosfato 0,05 M pH 3,3 (60:40-v/v) (HOPMANS & MURPHY, 1993; RICE & ROSS, 1994; RICE et alii, 1995). Na eluição por gradiente emprega-se a mistura de dois ou mais solventes, como metanol e tampão fosfato ou acetonitrila, água e ácido acético (BENNETT & RICHARD, 1994; HOLCOMB et alii, 1993b; LUKACS et alii, 1996; MARAGOS, 1995; MARAGOS & RICHARD, 1994; ROSS et alii, 1991; SCOTT & LAWRENCE, 1992, 1994, 1995 e 1996; THAKUR & SMITH, 1996; VELÁZQUEZ et alii, 1995).

Tabela 5 - Métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise de fumonisinas.

Detecção	Fase móvel	Limite de detecção (µg/g)	Referências
Ultra-violeta			
anidrido maléico (230 a 250 nm)	metanol-tampão fosfato 0,05 a 0,1M pH 3,3 a 3,8 (70:30)	FB1 - 10 a 40 FB2 - 80 a 100	04, 05, 10, 15, 57
Fluorescência			
fluorescamina λ exc - 390 nm λ em - 475 nm	acetonitrila-tampão acetato 0,1M pH 3,3 (1:1) acetonitrila-KCl 1%-ácido acético (40:59:1) Gradiente: A 100%, 0,1 min → A e B 50%, 6 min → B 100%, 4 min. A = acetonitrila-água-ácido acético (40:59:1) B = acetonitrila-água-ácido acético (60:39:1)	FB1 - 0,05 a 1 FB2 - 1 a 5	18, 57 39 38
o-ftaldialdeído (OPA) λ exc - 335 nm λ em - 440 nm	metanol-tampão fosfato 0,1M pH 3,3 (80:20) metanol-tampão fosfato 0,1M pH 3,3 (68:32) metanol-tampão fosfato 0,1M pH 3,3 (66:34) acetonitrila-água-ácido acético (50:50:1) acetonitrila-tampão fosfato 0,05M pH 3,3 (40:60) metanol-água-ácido acético (77:23:1) Gradiente: 1) metanol-fosfato (55:45) → ace- tonitrila-água (8:2), 10 min 2) A → B, 9 min → C, 17 min A = acetonitrila-água-ácido acético (40:59:1) B = acetonitrila-água-ácido acético (60:39:1) C = acetonitrila	FB1 - 0,05 FB2 - 0,10 FB1 e FB2 - 0,01 FB1 - 0,025 FB2 - 0,05 FB1 - 0,02	29, 38, 52 58 53, 64 55, 69 20, 35, 36 12 43, 44 65
naftaleno-2,3- dicarboxaldeído (NDA) λ exc - 410-420 nm λ em - 440-500 nm	acetonitrila-água-ácido acético (55:45:1) acetonitrila-água-ácido acético (60:40:1) Gradiente: 1) acetonitrila-água-ácido acético (55:45:1), 10 min → acetonitri- la-água (8:2), 7 min 2) A 60% e B 40%, 8 min → A 80% e B 20%, 16 min A = acetonitrila-água (99:1) B = água-ácido acético (99:1) 3) A 70% e B 30%, 2,6 min → A 55% e B 45%, 10,1 min → B 100%, 14,1 min A = metanol-água-ácido acético (75:24:1) B = acetonitrila-água-ácido acético (75:24:1)	FB1 - 0,01	75 08, 76 43, 45, 46 08 28

Tabela 5 - (continuação)

Detecção	Fase móvel	Limite de detecção (µg/g)	Referências
4-fluor-7-nitro- benzeno-2-oxa- 1,3-diazol (NBD-F) λ exc - 460 nm λ em - 500 nm	Gradiente: A 100%, 5 min → A e B 50%, 15 min → B 100%, 10 min A = metanol-tampão fosfato pH 5 (1:1) B = acetonitrila-água (8:2)	FB1 - 0,02 FB2 - 0,02 HFB1 - 0,01	43, 44, 45, 46
6-aminoquinolil- N-hidrosuccini- midil carbamato (AccQ-Fluor) λ exc - 395 nm λ em - 418 nm	Gradiente: A e B 50%, 11 min → B 65% e A 35%, 2 min A = tampão fosfato 0,1 M pH 7 B = metanol	FB1 - 0,26	71
9-fluorenilmetil cloroformato (FMOc) λ exc - 263 nm λ em - 313 nm	Gradiente: B 40% e A 60%, 9 min → B 70% e A 30%, 8 min → B 100%, 1 min A = acetonitrila-tampão citrato (30:70) B = acetonitrila-tampão citrato (70:30)	FB1 - 0,2	19
isotiocianato de fluoresceína (FITC) λ exc - 488 nm λ em - 520 nm	Gradiente: A 30% e B 70% → A 42% e B 38%, 7,2 min → A 90% e B 10%, 12 min → A 30%, 4 min A = metanol B = tampão fosfato 0,01 M pH 7,5	FB1 - 0,02	24
4-(N,N-dimetila- minosulfonil)-7- fluoro-2,1,3- benzoxadiazol (DBD-F) λ exc - 450 nm λ em - 590 nm	Gradiente: A 100% → B 15%, 5 min → B 90%, 13 min A = tampão fosfato 0,05 M-metanol (1:1) B = acetonitrila-água (75:25)	FB1 - 0,01 FB2 - 0,01	02, 03
Espectrometria de massas	Gradiente: B 40% e A 60% → B 100%, 7 min A = 0,05% de ácido trifluoroacético B = 0,05% de ácido trifluoroacético em metanol	FB1 - 0,0008	23

As fumonisinas não absorvem radiação ultravioleta (UV) e não fluorescem, portanto é necessário sofrerem uma modificação química para serem observadas pelos detectores comuns de CLAE.

O primeiro procedimento analítico por CLAE para análise de fumonisinas envolveu a modificação do método de SYLER & GILCHRIST (1982) para determinação de ficotoxinas de *Alternaria alternata*. Um derivado maleil de FB₁, FB₂ e FB₃ foi preparado a partir do anidrido maléico para detecção a 230 nm (ALBERTS et alii, 1990 e 1992; CAWOOD et alii, 1991; SYDENHAM et alii, 1990a) ou 250 nm (GELDERBLOM et alii, 1988). Este método foi satisfatório para análise de culturas de fungos, pois tais culturas possuem altos teores de fumonisinas, mas esta metodologia foi pouco sensível para amostras naturalmente contaminadas (AZCONA-OLIVERA et alii, 1992a; NORRED, 1993). A sensibilidade na análise de fumonisinas por CLAE foi aumentada significativamente com a conversão para derivados fluorescentes e, portanto, o uso de detectores de fluorescência.

A derivação pré-coluna da amina primária das fumonisinas tem sido amplamente utilizada na determinação por CLAE com detecção de fluorescência. A fluorescamina é um dos reagentes utilizados na derivação de fumonisinas (HOLCOMB et alii, 1993a; ROSS et alii, 1991; ROTTINGHAUS et alii, 1992; SYDENHAM et alii, 1990a). Entretanto, o derivado fumonisina-fluorescamina elui em dois picos devido a formação de derivados ácido/álcool e lactona, o que dificulta a determinação quantitativa dos analitos em questão. Segundo ROSS et alii (1991), a razão dos dois picos foi constante quando utilizaram uma fase móvel de pH baixo, portanto ambos os picos foram usados para quantificação. Obtiveram assim um limite de detecção de 1 µg/g para FB₁ e 5 µg/g para FB₂. HOLCOMB et alii (1993a) relataram que o uso de ácido acético na fase móvel diminuiu satisfatoriamente o tamanho do pico menor (lactona-fluorescamina) e o limite de detecção aumenta para 0,5 µg/g para FB₁.

O amplo uso do orto-ftaldialdeído (OPA) como agente na derivação para determinação de fumonisinas por CLAE deve-se à sua simplicidade e sensibilidade (limite de detecção de 50 ng FB₁/g e 100 ng FB₂/g) (SHEPHARD et alii, 1990). Os derivados OPA-fumonisinas são preparados sob condições alcalinas (pH 9 a 10) na presença de 2-mercaptoetanol (Figura 4). SYDENHAM et alii (1992) avaliaram a estabilidade do derivado e observaram que não há diferença significativa quando a injeção no cromatógrafo a líquido ocorre até 4 minutos,

entretanto, após 8 minutos, a resposta foi 95% da previamente observada e após 64 minutos, diminui 48% da leitura inicial. TRUCKSESS et alii (1995) demonstraram que a intensidade máxima do derivado é obtida em 1 minuto após a adição do reagente OPA no extrato, e que a intensidade de fluorescência diminui 15% após 10 minutos e 30% após 1 hora da reação. Apenas RICE et alii (1995) demonstraram que a reação completa entre o OPA e as fumonisinas ocorre em um pH entre 8 a 8,5 e que não há alteração estatisticamente significativa no tempo de reação entre 4 a 40 minutos. Entretanto, o sinal cromatográfico é diminuído significativamente em um tempo menor que 4 minutos. Nesta técnica a razão de 20 mg de OPA e 20 μ L de 2-mercaptoetanol em 10 mL de acetonitrila apresentou uma melhor resposta e estabilidade do derivado formado.

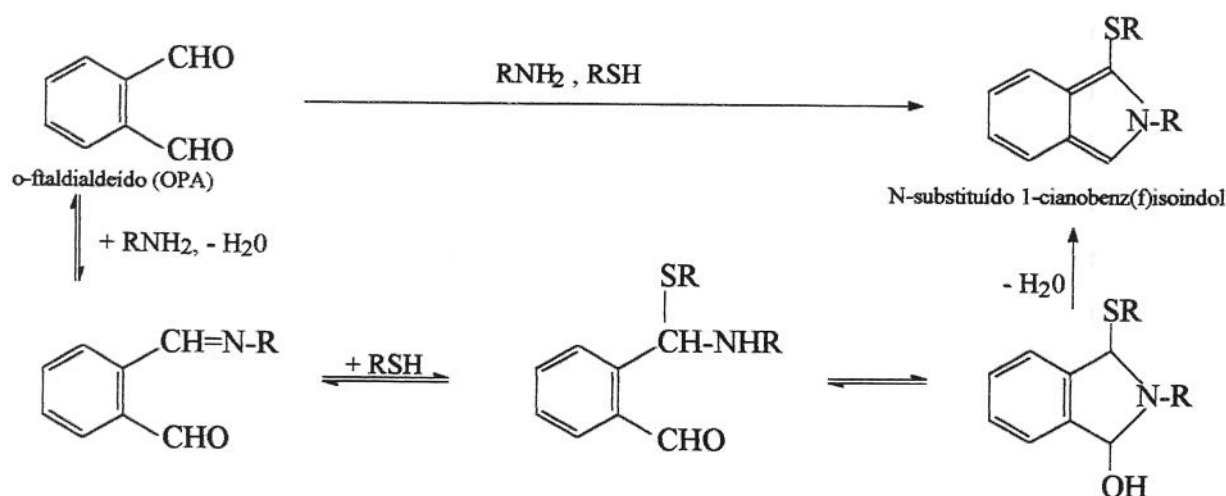


Figura 4 - Reação da amina primária da fumonisina com o o-ftaldialdeído (OPA) na presença de 2-mercaptoetanol para formar um derivado N-substituído 1-cianobenz(f)isoindol (MONTIGNY et alii, 1987).

O procedimento de WARE et alii (1993) emprega o naftaleno-2,3-dicarboxaldeído (NDA) como agente na derivação para a detecção de fumonisinas em milho e seus derivados. O NDA reage com aminas primárias na presença do íon cianeto para formar um derivado 1-cianobenz(f)isoindol, como mostrado na figura 5 (BENNETT & RICHARD, 1994; WARE et alii, 1993). Este procedimento é sensível (limite de detecção de 10 ng FB₁/g) e o derivado é altamente

estável, apenas 12% do derivado NDA-fumonisina foi reduzido em um período de 25 horas (WARE et alii, 1993). O derivado possui uma intensa banda de absorção UV em 250 nm e dois máximos de excitação fracos na região visível em aproximadamente 420 e 440 nm. O comprimento de onda de 410 nm é o mais utilizado para excitação (λ_{exc}) por apresentar menos interferentes na matriz. WARE et alii (1994) indicaram que dois compostos fluorescentes são formados durante a reação de derivação do NDA com a FB₁ e que poderiam interferir na quantificação da FB₁, porém isto pode ser ajustado alterando a composição orgânica da fase móvel.

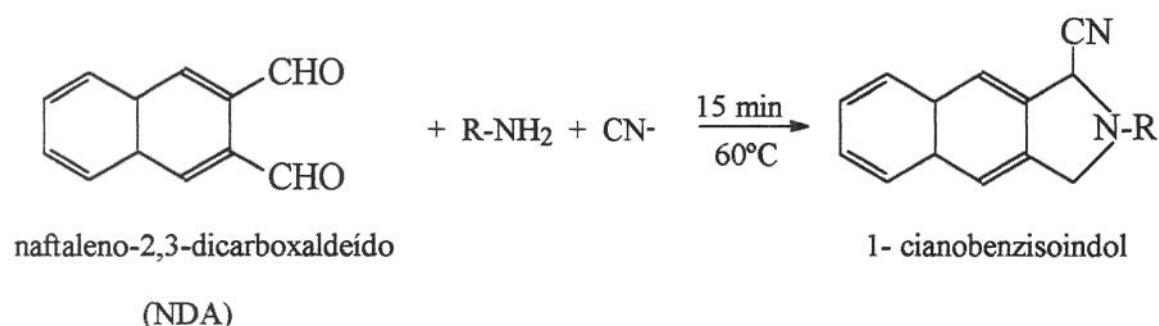


Figura 5 - Reação da amina primária da fumonisina com o naftaleno-2,3-dicarboxaldeído (NDA) na presença do íon cianeto para formar um derivado estável (BENNETT & RICHARD, 1994).

SCOTT & LAWRENCE (1992, 1994) recomendaram o emprego do reagente 4-fluor-7-nitro-benzeno-2-oxa-1,3-diazol (NBD-F) na determinação de fumonisinas. O NBD-F reage com o grupo amino primário das fumonisinas, onde o tempo de 1 minuto de reação a 60°C foi suficiente para ocorrer a formação do derivado (Figura 6). A estabilidade do derivado NBD-fumonisina foi de aproximadamente 20 minutos, e a omissão de HCl 1 N na etapa de derivação aumentou a estabilidade dos derivados para cerca de 210 minutos. Entretanto, o derivado formado não foi suficientemente estável em procedimento automatizado (AKIYAMA et alii, 1995).

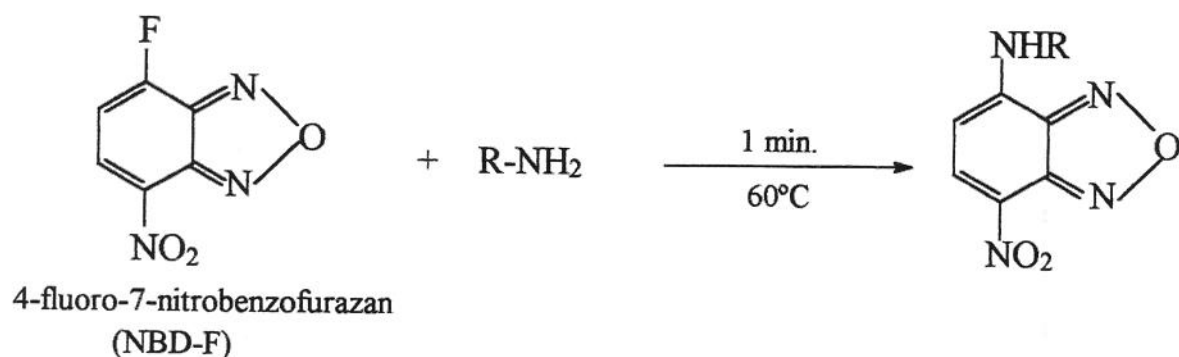


Figura 6 - Reação da amina primária da fumonisina com o 4-fluor-7-nitro-benzeno-2-oxa-1,3-diazol (NBD-F) para formar um derivado estável (SCOTT & LAWRENCE, 1992).

Outros reagentes de derivação usados na determinação de fumonisinas por CLAE são: 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC - limite de detecção (LD) de 0,2 µg/g) (HOLCOMB et alii, 1993b), 6-aminoquinolil N-hidroxisuccinimidilcarbamato (AccQ-Fluor - LD de 0,26 µg/g) (VELÁZQUEZ et alii, 1995), isotiocianato de fluoresceína (FITC - LD de 0,05 µg/g) (MARAGOS, 1995) e o 4-(N,N-dimetilaminosulfonil)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazol (DBD-F - LD de 10 ng/g) (AKIYAMA et alii, 1994 e 1995).

MIYAHARA et alii (1996) desenvolveram um método de alta sensibilidade (0,08 µg/g para FB₁ e FB₂), utilizaram cromatografia de par iônico e derivação pós-coluna. A reação de derivação das fumonisinas é realizada com OPA e N-acetil cisteína após a passagem destas pela coluna cromatográfica e detectadas por fluorescência cujo λ exc é 336 nm e o λ emissão é 460 nm.

O uso de detectores de massas ou espectrometria de massas para a detecção, identificação e quantificação de fumonisinas separadas por CLAE tem sido relatado recentemente (LUKACS et alii, 1996; THAKUR & SMITH, 1996; XIE et alii, 1997) e demonstrado sensibilidade (limite de quantificação de 0,8 ng/g) e seletividade.

Espectrometria de massas

A espectrometria de massas tem sido usada em muitos estudos para a identificação e consequentemente, confirmação na análise de fumonisinas. BEZUIDENHOUT et alii (1988) e PLATTNER et alii (1990) identificaram a FB₁ por espectrometria de massas de íon secundário (SIMS), pois o íon molecular formado por impacto de elétrons é muito instável, portanto, realizou-se a ionização química das moléculas de fumonisinas com isobutano a altas pressões (0,3 torr), formando o íon molecular protonado de m/z 722 para FB₁ e de m/z 706 para FB₂. A técnica acima requer que a amostra seja vaporizada antes da ionização, tornando difícil a análise de FB₁ por ser uma molécula lábil ou estar na forma ionizada. KORFMACHER et alii (1991) utilizaram técnicas de ionização alternativas como “*thermospray*”, “*electrospray*” e “*fast atom bombardment*” e demonstraram que o “*Electrospray Mass Spectrometry*” (ESMS) e o “*Fast-atom Bombardment Mass Spectrometry*” (FABMS) são úteis na determinação de nanogramas do analito em questão, enquanto o “*Thermospray Mass Spectrometry*” (TSMS) analisa quantidades maiores (microgramas) de FB₁. A confirmação da presença de fumonisinas na amostra analisada é realizada com detectores de massas ou espectrômetros de massas acoplados ao cromatógrafo gasoso (CHUNG & KIM, 1995; RICE & ROSS, 1994; THIEL et alii, 1992; VESONDER et alii, 1990; VOSS et alii, 1990) ou ao cromatógrafo líquido (LUKACS et alii, 1996; THAKUR & SMITH, 1996; XIE et alii, 1997).

Eletroforese capilar

As fumonisinas podem ser separadas por técnicas eletroforéticas devido a presença dos dois grupos de ácido tricarbálico em sua estrutura (Figura 2). MARAGOS (1995) preparou derivados de FB₁, FB₂ e hidrolizado de FB₁ (HFB₁) com isotiocianato de fluoresceína e os analisou por eletroforese capilar (CZE) com detector de fluorescência. O limite de detecção relatado foi de 0,025 pg para FB₁. O problema do método é a possível decomposição das fumonisinas devido as condições de reação de derivação, como: longo tempo de reação (90

minutos), alta temperatura (60°C) e pH alcalino (9,5); o que levaria a resultados falsos negativos (MIYAHARA et alii, 1996).

Segundo MARAGOS et alii (1996a) as vantagens do uso da eletroforese capilar na análise de fumonisinas em milho são: o volume de amostra usado é pequeno e o volume de resíduos de solventes é menor que as técnicas cromatográficas. Enquanto as desvantagens são o longo tempo da etapa de derivação, já citado acima, e o custo do equipamento.

Imunoensaios

A produção de anticorpos para ensaios imunoenzimáticos (EIA) tem sido desenvolvida para a análise direta e indireta de fumonisinas (AZCONA-OLIVERA, 1992a e b; COLVIN & HARRISON, 1992; MARAGOS et alii, 1996b; SCHNEIDER et alii, 1995; SCOTT et alii, 1997; SHON & KIM, 1997; SUTIKNO et alii, 1996; USLEBER et alii, 1994; YEUNG et alii, 1996). AZCONA-OLIVERA et alii (1992a e b) obtiveram anticorpos monoclonais e policlonais, contra a FB₁, de linfócitos esplênicos de ratos imunizados com o conjugado FB₁-toxina colérica. O teste direto competitivo ELISA baseado em anticorpos monoclonais foi desenvolvido, onde o conjugado FB₁-peroxidase e FB₁ livre competem pelo anticorpo imobilizado nas placas (AZCONA-OLIVERA, 1992b; MARAGOS et alii, 1996b). Se a micotoxina está presente na amostra (FB₁ livre) ela poderia se ligar ao anticorpo na placa, ao invés do conjugado FB₁-peroxidase, diminuindo a quantidade do sinal espectrofotométrico. O limite de detecção foi de 50 ng/mL para FB₁ (AZCONA-OLIVERA, 1992b) e de 2 ng/mL para HFB1 (MARAGOS et alii, 1997). USLEBER et alii (1994) e SCHNEIDER et alii (1995) prepararam anticorpos policlonais contra FB₁, os quais foram também utilizados em um teste direto competitivo ELISA em placas e membranas, respectivamente. O limite de detecção para FB₁ foi de 0,17 ng/mL (USLEBER et alii, 1994) no teste em placas e de 40-60 ng/g (SCHNEIDER et alii, 1995) em membranas para amostras de milho. As fumonisinas são superestimadas em testes diretos competitivos ELISA como indicam os estudos comparativos

(PETSKA et alii, 1994; SUTIKNO et alii, 1996; SYDENHAM et alii, 1996a e c; TEJADA-SIMON et alii, 1995), isto deve-se a matriz alimentar que aumenta a resposta inibitória no teste ELISA ou devido a reação cruzada entre compostos estruturalmente relacionados a FB₁.

SHELBY & KELLEY (1992) descreveram um teste indireto competitivo ELISA para análise de FB₁ em milho com anticorpos monoclonais, onde o conjugado FB₁-albumina bovina imobilizado e FB₁ livre competem pelo anticorpo anti-FB₁ livre. Se a micotoxina está presente na amostra (FB₁ livre), o anticorpo anti-FB₁ ligado à enzima ligara-se a FB₁ da amostra ao invés da FB₁-albumina bovina imobilizada na placa, diminuindo a resposta espectrofotométrica. SHELBY et alii (1994) compararam o método acima com o de ROTTINGHAUS et alii (1992) por cromatografia em camada delgada, e observaram que o método de ELISA indicou uma maior quantidade de FB₁, devido a reação cruzada com as outras fumonisinas.

Outros métodos usados na determinação de fumonisinas por imunoensaios são o uso de imunossensor de fibra óptica (THOMPSON & MARAGOS, 1996) e a produção de anticorpos anti-idiotipo (CHU et alii, 1995).

CONFIRMAÇÃO

A etapa final da metodologia analítica é a confirmação da identidade das fumonisinas. A confirmação do resultado analítico pode ser realizada através de derivação química, onde o derivado formado possui características cromatográficas distintas da micotoxina inalterada. Segundo ROTTINGHAUS et alii (1992) um dos testes confirmatórios é a formação de amino-alcóois C₂₂ a partir da hidrólise da FB₁ e FB₂ e análise por cromatografia em camada delgada, utilizando fluorescamina como agente revelador. A espectrometria de massas acoplada ao cromatógrafo gasoso ou líquido de alta eficiência é um procedimento de confirmação altamente específico na análise de fumonisinas (CHUNG & KIM, 1995; LUKACS et alii, 1996;

RICE & ROSS, 1994; THIEL et alii, 1992; VESONDER et alii, 1990; VOSS et alii, 1990), onde a monitorização de três íons é preferível para a exatidão da identidade, para FB₁ são eles m/z 722, 406 e 187 (PLATTNER et alii, 1990). Estes métodos são seletivos e sensíveis, mas requerem equipamentos de alto custo. Procedimentos mais acessíveis e de menor custo são os imunoensaios, devido a especificidade pelo sucesso na produção de anticorpos policlonais e monoclonais contra a FB₁, FB₂ e FB₃ (NORRED, 1993).

ESTUDOS COLABORATIVOS

Os estudos colaborativos inter-laboratoriais realizam uma rigorosa avaliação da exatidão, repetibilidade (variação intra-laboratorial) e reprodutibilidade (variação inter-laboratorial) (SCOTT, 1995). No estudo colaborativo o número mínimo de amostras analisadas por 8 ou mais laboratórios é cinco, sendo necessário realizar uma ou mais replicatas. Estes resultados serão analisados estatisticamente fornecendo dados sobre “outliers”, erros sistemáticos, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), valores falso positivos e falso negativos.

Somente dois métodos publicados para análise de fumonisinas foram testados em estudos colaborativos (SYDENHAM et alii, 1996b; THIEL et alii, 1993) e um estudo de intercomparação na Comunidade Européia (VISCONTI et alii, 1996). O método de SHEPHARD et alii (1990) para determinação de FB₁ e FB₂ em milho foi estudado cooperativamente por 11 laboratórios (THIEL et alii, 1993). A variação intra-laboratorial foi de 7,7 a 25,5% para FB₁ e 12,5 a 36,8% para FB₂, enquanto a variação inter-laboratorial foi de 18 a 26,7% para FB₁ e 28 a 45,6% para FB₂. A razão HORRAT, que é a razão entre o desvio padrão relativo encontrado no estudo interlaboratorial e o desvio padrão calculado pela equação de Horwitz (SYDENHAM et alii, 1996b; THIEL et alii, 1993), demonstrou reprodutibilidade aceitável em todas as concentrações de FB₁ testadas e 4 das 5 concentrações de FB₂ analisadas, pois os valores foram

inferiores a 2. A recuperação de FB₁ e FB₂ foi de 99,5 e 85,9%, respectivamente (SHEPHARD et alii, 1990).

O segundo estudo colaborativo (SYDENHAM et alii, 1996b) envolveu 12 participantes e verificaram o método de SYDENHAM et alii (1992), que baseia-se no método de SHEPHARD et alii (1990) com acréscimo da FB₃. A recuperação foi de 81,1 a 84,2%, 75,9 a 81,9% e 75,8 a 86,8% para FB₁, FB₂ e FB₃, respectivamente. A variação intra-laboratorial variou de 5,8 a 13,2% para FB₁, de 7,2 a 17,5% para FB₂ e 8 a 17,2% para FB₃. A variação inter-laboratorial variou de 13,9 a 22,2% para FB₁, de 15,8 a 26,7% para FB₂ e 19,5 a 24,9% para FB₃. A razão HORRAT variou de 0,75 a 1,73 demonstrando reprodutibilidade aceitável.

CONCLUSÕES

De acordo com as recomendações evidenciadas pelos diversos autores, pode-se concluir que:

- os métodos analíticos para a determinação de fumonisinas têm sido desenvolvidos, mas são necessários alguns melhoramentos para se tornarem mais exatos, baratos e rápidos.
- recuperações melhores têm sido obtidas com o uso de colunas de troca iônica forte (TAF) ao invés das colunas de fase reversa (C₁₈) na etapa de limpeza (BENNETT & RICHARD, 1994; SYDENHAM et alii, 1992; VISCONTI et alii, 1996).
- imunoenaios são úteis para uma triagem rápida e confirmação dos resultados.
- a realização de estudos colaborativos inter-laboratoriais deve ser incentivada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ACKERMANN, T. Fast thin-layer chromatography sustems for fumonisin isolation and identification. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 11, n. 6, p. 451, 1991.
02. AKIYAMA, H.; MIYAHARA, M.; TOYODA, M.; SAITO, Y. Comparison of several fluorescence HPLC methods for fumonisin analysis. **Bulletin of National Institute of Health Sciences**, Tokyo, v. 112, p. 112-117, 1994.
03. AKIYAMA, H.; MIYARA, M.; TOYODA, M.; SAITO, Y. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn by precolumn derivatization with 4(N,N-dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-F). **Journal of Food Hygienic Society of Japan**, Shokuhin, v. 36, n. 1, p. 77-81, Feb. 1995.
04. ALBERTS, J.F.; GELDERBLOM, W.C.A.; MARASAS, W.F.O. Evaluation of the extraction and purification procedures of the maleyl derivatization HPLC technique for the quantification of the fumonisin B mycotoxins in corn cultures. **Mycotoxin Research**, Mainz, v. 8, n. 1, p. 2-12, Aug. 1992.
05. ALBERTS, J.F.; GELDERBLOM, W.C.A.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SCHALKWYK, D.J.; BEHEREND, Y. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 6, p. 1729-1733, June 1990.
06. AZCONA-OLIVERA, J.I.; ABOUZIED, M.M.; PLATTNER, R.D.; NORRED, W.P.; PESTKA, J.J. Generation of antibodies reactive with fumonisins B₁, B₂, and B₃ by using cholera toxin as the carrier-adjuvant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 1, p. 169-173, Jan. 1992a.
07. AZCONA-OLIVERA, J.I.; ABOUZIED, M.M.; PLATTNER, R.D.; PESTKA, J.J. Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins fumonisins B₁, B₂, and B₃. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, n. 3, p. 531-534, 1992b.
08. BENNETT, G.A.; RICHARD, J.L. Liquid chromatographic method for analysis of the naphthalene dicarboxaldehyde derivative of fumonisins. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 77, n. 2, p. 501-506, 1994.
09. BEZUIDENHOUT, S.C.; GELDERBLOM, W.C.A.; GORST-ALLMAN, C.P.; HORAK, R.M.; MARASAS, W.F.O.; SPITELLER, G.; VLEGGAAR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society Chemical Communications**, Cambridge, v. 11, p. 743-745, 1988.

10. CAWOOD, M.E.; GELDERBLOM, W.C.A.; VLEGGAAR, R.; BEHREND, Y.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O. Isolation of the fumonisin mycotoxins: a quantitative approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, n. 11, p. 1958-1962, 1991.
11. CHU, F.S.; HUANG, X.; MARAGOS, C.M. Production and characterization of anti-idiotypic and anti-anti-idiotypic antibodies against fumonisin B₁. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 1, p. 261-267, 1995.
12. CHUNG, S.H.; KIM, Y.B. Natural occurrence of fumonisin B₁ in Korean corn and rough rice. **Food and Biotechnology**, New York, v. 4, n. 3, p. 212-216, 1995.
13. COLVIN, B.M.; HARRISON, L.R. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in suine. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, p. 79-82, 1992.
14. DAWLATANA, M.; COKER, R.D.; NAGLER, M.J.; BLUNDEN, G. A normal phase HPTLC method for the quantitative determination of fumonisin B₁ in rice. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 41, n. 3/4, p. 187-190, Aug. 1995.
15. GELDERBLOM, W.C.A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; HORAK, R.M.; VLEGGAAR, R.; KRIEK, N.P.J. Fumonisin - novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 7, p. 1806-1811, July 1988.
16. GELDERBLOM, W.C.A.; KRIEK, N.P.J.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁, in rats. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 12, n. 7, p. 1247-1251, 1991.
17. HANSEN, T.J.; ZABE, N.A.; SKIPPER, P.L. Immunoaffinity isolation of fumonisin B₁ and application to analysis in corn. **Abst. 106th AOAC Int. Ann. Mtg.**, Cincinnati, 1993. p. 230.
18. HOLCOMB, M.; SUTHERLAND, J.B.; CHIARELLI, M.P.; KORFMACHER, W.A.; THOMPSON Jr, H.C.; LAY Jr, J.O.; HANKINS, L.J.; CERNIGLIA, C.E. HPLC and FAB Mass Spectrometry analysis of fumonisins B₁ and B₂ produced by *Fusarium moniliforme* on food substrates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 41, n. 3, p. 357-360, 1993a.
19. HOLCOMB, M.; THOMPSON Jr, H.C.; HANKINS, L.J. Analysis of fumonisin B₁ in rodent feed by gradient elution HPLC using precolumn derivatization with FMOC and fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 41, n. 5, p. 764-767, 1993b.

20. HOPMANS, E.C.; MURPHY, P.A. Detection of fumonisins B₁, B₂, and B₃ and hydrolyzed fumonisin B₁ in corn-containing foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 41, n. 10, p. 1655-1658, 1993.
21. JACKSON, M.A.; BENNETT, G.A. Production of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme* NRRL 13616 in submerged culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 8, p. 2296-2298, Aug. 1990.
22. KORFMACHER, W.A.; CHIARELLI, M.P.; LAY Jr., J.O.; BLOOM, J.; HOLCOMB, M.; McMANUS, K.T. Characterization of the mycotoxin fumonisin B₁: comparison of thermospray, fast-atom bombardment and electrospray mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 5, n. 10, p. 463-468, 1991.
23. LUKACS, Z.; SCHAPER, S.; HERDERICH, M.; SCHREIER, P.; HUMPF, H.U. Identification and determination of fumonisin FB₁ and FB₂ in corn and corn products by high-performance liquid chromatography-electrospray-ionization Tandem Mass Spectrometry (HPLC-ESI-MS-MS). **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 43, n. 3/4, p. 124-128, Aug. 1996.
24. MARAGOS, C.M. Capillary zone electrophoresis and HPLC for the analysis of fluorescein isothiocyanate-labeled fumonisin B₁. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 2, p. 390-394, 1995.
25. MARAGOS, C.M.; BENNETT, G.A.; RICHARD, J.L. Affinity column for the analysis of fumonisins and their hydrolysis products in corn. **Food and Agricultural Immunology**, Abingdon, v. 9, n. 1, p. 3-12, 1997.
26. MARAGOS, C.M.; BENNETT, G.A.; RICHARD, J.L. Analysis of fumonisin B₁ in corn by capillary electrophoresis. In: JACKSON, L.S.; DEVRIES, J.W.; BULLERMAN, L.B. (eds.) **Fumonisins in food**. Plenum Press: New York, 1996a, pp. 105-112.
27. MARAGOS, C.M.; PLATTNER, R.D.; MIKLASZ, S.D. Determination of hydrolysed fumonisin B₁ (HFB₁) in corn by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 1, p. 105-113, 1996b.
28. MARAGOS, C.M.; RICHARD, J.L. Quantitation and stability of fumonisins B₁ and B₂ in milk. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 77, n. 5, p. 1162-1167, 1994.
29. MEREDITH, F.I.; BACON, C.W.; PLATTNER, R.D.; NORRED, W.P. Preparative LC isolation and purification of fumonisin B₁ from rice culture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 1, p. 195-198, 1996.
30. MIYAHARA, M.; AKIYAMA, H.; TOYODA, M.; SAITO, Y. New procedure for fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn products by ion pair chromatography with o-

phthaldialdehyde postcolumn derivatization and fluorometric detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 3, p. 842-847, 1996.

31. MONTIGNY, P.; STOBAUGH, J.F.; GIVENS, R.S.; CARLSON, R.G.; SRINIVASACHAR, K.; STERNSON, L.A.; HIGUCHI, T. Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde/cyanide ion: a rationally designed fluorogenic reagent for primary amines. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 59, n. 8, p. 1096-1101, Apr. 1987.
32. NORRED, W.P. Fumonisin-mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Washington, v. 38, n. 3, p. 309-328, 1993.
33. PETSKA, J.J.; AZCONA-OLIVERA, 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**, Des Moines, v. 57, n. 2, p. 167-172, Feb. 1994.
34. PLATTNER, R.D.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; VOSS, K.A.; PETERSON, R.; SHACKELFORD, D.D.; WEISLEDER, D. A method of detection of fumonisins in corn samples associated with field cases of equine leukoencephalomalacia. **Mycologia**, New York, v. 82, n. 6, p. 698-702, 1990.
35. RICE, L.G.; ROSS, P.F. Methods for detection and quantitation of fumonisins in corn, cereal products and animal excreta. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 57, n. 6, p. 536-540, June 1994.
36. RICE, L.G.; ROSS, P.F.; DEJONG, J.; PLATTNER, R.D.; COATS, J.R. Evaluation of a liquid chromatographic method for the determination of fumonisins in corn, poultry feed, and *Fusarium* culture material. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 78, n. 4, p. 1002-1009, 1995.
37. ROSS, P.F.; LEDET, A.E.; OWENS, D.L.; RICE, L.G.; NELSON, H.A.; OSWEILER, G.D.; WILSON, T.M. Experimental equine leukoencephalomalacia, toxic hepatitis, and encephalopathy caused by corn naturally contaminated with fumonisins. **Journal of Veterinary Diagnostics and Investigation**, Turlock, v. 5, n. 1, p. 69, 1993.
38. ROSS, P.F.; RICE, L.G.; PLATTNER, R.D.; OSWEILER, G.D.; WILSON, T.M.; OWENS, D.L.; NELSON, H.A.; RICHARD, J.L. Concentrations of fumonisin B₁ in feeds associated with animal health problems. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 114, n. 3, p. 129-135, 1991.
39. ROTTINGHAUS, G.E.; COATNEY, C.E.; MINOR, H.C. A rapid, sensitive thin layer chromatography procedure for the detection of fumonisin B₁ and B₂. **Journal of Veterinary Diagnostics and Investigation**, Turlock, v. 4, n. 3, p. 326-329, 1992.

40. SCHNEIDER, E.; USLEBER, E.; MÄRTLBAUER, E. Rapid detection of fumonisin B₁ in corn-based food by competitive direct dipstick enzyme immunoassay/enzyme-linked immunofiltration assay with integrated negative control reaction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 9, p. 2548-2552, 1995.
41. SCOTT, P.M. Fumonisin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 18, n. 4, p. 257-270, 1993.
42. SCOTT, P.M. Mycotoxin methodology. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 12, n. 3, p. 395-403, 1995.
43. SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G.A. Analysis of beer for fumonisins. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 12, p. 1379-1382, Dec. 1995.
44. SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G.A. Determination of hydrolysed fumonisin B₁ in alkali-processed corn foods. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 7, p. 823-832, 1996.
45. SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G.A. Liquid chromatographic determination of fumonisins with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 75, n. 5, p. 829-834, 1992.
46. SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G.A. Stability and problems in recovery of fumonisins added to corn-based foods. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 77, n. 2, p. 541-545, 1994.
47. SCOTT, P.M.; TRUCKSESS, M.W. Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 80, n. 5, p. 941-949, 1997.
48. SCOTT, P.M.; YEUNG, J.M.; LAWRENCE, G.A.; PRELUSKY, D.B. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for analysis of beer for fumonisins. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 14, n. 5, p. 445-450, 1997.
49. SELIM, M.I.; EL-SHARKAWY, S.H.; POPENDORF, W.J. Supercritical fluid extraction of fumonisin B₁ from grain dust. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 10, p. 3224-3229, 1996.
50. SHELBY, R.A.; KELLEY, V.C. Detection of fumonisins in corn by immunoassay. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, p. 500, 1992.
51. SHELBY, R.A.; ROTTINGHAUS, G.E.; MINOR, H.C. Comparison of thin-layer chromatography and competitive immunoassay methods for detection of fumonisin on maize. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, n. 9, p. 2064-2067, 1994.

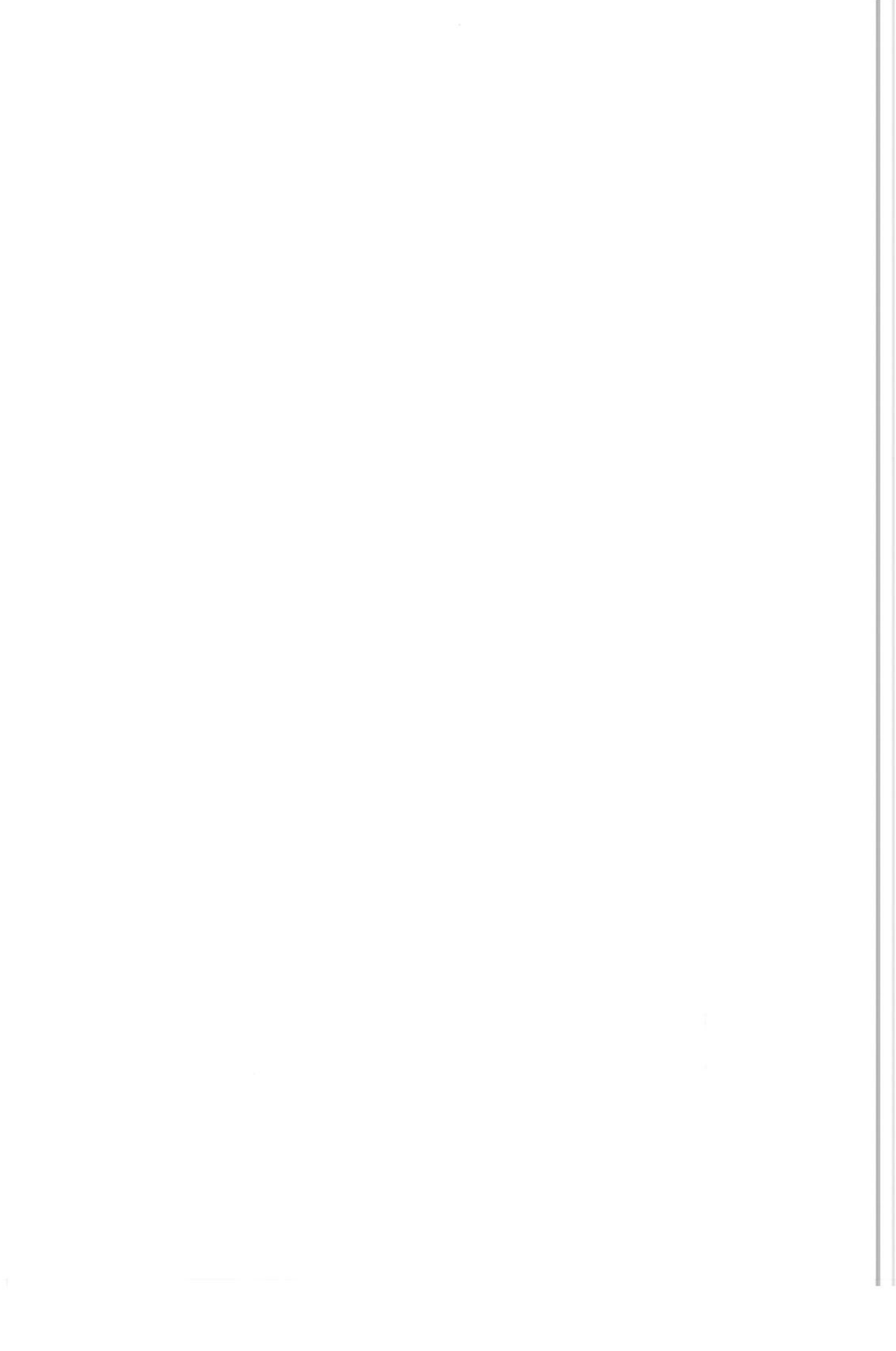
52. SHEPHARD, G.S.; SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; GELDERBLOM, W.C.A. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, New York, v. 13, n. 10, p. 2077-2087, Oct. 1990.
53. SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W. Determination of fumonisin B₁ in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 574, n. 2, p. 299-304, 1992.
54. SHON, D.H.; KIM, Y.M. An enzyme-linked immunosorbent assay for fumonisins in corn without cleanup procedure. **Korean Journal of Food Science and Technology**, v. 28, n. 5, p. 953-958, 1997.
55. STACK, M.E.; EPPLEY, R.M. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn products. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 75, n. 5, p. 834-837, 1992.
56. SUTIKNO; ABOUZIED, M.M.; AZCONA-OLIVERA, J.I.; HART, L.P.; PESTKA, J.J. Detection of fumonisins in *Fusarium* cultures, corn, and corn products by polyclonal antibody-based ELISA: relation to fumonisin B₁ detection by liquid chromatography. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 6, p. 645-651, June 1996.
57. SYDENHAM, E.W.; GELDERBLOM, W.C.A.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 1, p. 285-290, 1990a.
58. SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂, and B₃ in foods and feeds. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 75, n. 2, p. 313-318, 1992.
59. SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; BIRD, C.; MILLER, B.M. Determination of fumonisins in corn: evaluation of competitive immunoassay and HPLC techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 1, p. 159-164, 1996a.
60. SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; STOCKENSTRÖM, S.; SNIJMAN, P.W.; SCHALKWYK, D.J. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂, and B₃ in corn: AOAC-IUPAC collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 79, n. 3, p. 688-695, May/June 1996b.
61. SYDENHAM, E.W.; STOCKENSTRÖM, S.; THIEL, P.G.; RHEEDER, J.P.; DOKO, M.B.; BIRD, C.; MILLER, B.M. Polyclonal antibody-based ELISA and HPLC methods for the determination of fumonisins in corn: a comparative study. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 8, p. 893-897, Aug. 1996c.

62. SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SHEPHARD, G.S.; SCHALKWYK, D.J.; KOCH, K.R. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 10, p. 1900-1903, 1990b.
63. SYLER, D.J.; GILCHRIST, D.J. Determination of host-selective phytotoxins from *Alternaria alternata* f. sp *lycopersici* as their maleyl derivatives by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 238, p. 167-173, 1982.
64. TEJADA-SIMON, M.V.; MAROVATSANGA, L.T.; PESTKA, J.J. Comparative detection of fumonisin by HPLC, ELISA, and immunocytochemical localization in *Fusarium* cultures. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 6, p. 666-672, June 1995.
65. THAKUR, R.A.; SMITH, J.S. Determination of fumonisins B₁ and B₂ and their major hydrolysis products in corn, feed, and meat, using HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 4, p. 1047-1052, 1996.
66. THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; GELDERBLUM, W.C.A. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, n. 1-2, p. 3-9, 1992.
67. THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; SCHALKWYK, D.J. Study of the reproductibility characteristics of a liquid chromatographic method for the determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn: IUPAC collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 76, n. 2, p. 361-366, 1993.
68. THOMPSON, V.S.; MARAGOS, C.M. Fiber-optic immunosensor for the detection of fumonisin B₁. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 4, p. 1041-1046, 1996.
69. TRUCKSESS, M.W.; STACK, M.E.; ALLEN, S.; BARRION, N. Immunoaffinity column coupled with liquid chromatography for determination of fumonisins B₁ in canned and frozen sweet corn. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 78, n. 3, p. 705-710, 1995.
70. USLEBER, E.; STRAKA, M.; TERPLAN, G. Enzyme immunoassay for fumonisin B₁ applied to corn-based food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, n. 6, p. 1392-1396, 1994.
71. VELÁZQUEZ, C.; BLOEMENDAL, C.; SANCHIS, V.; CANELA, R. Derivation of fumonisins B₁ and B₂ with 6-aminoquinolyl N-hydroxysuccinimidylcarbamate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 6, p. 1535-1537, 1995.

72. VESONDER, R.; PETERSON, R.; PLATTNER, R.D.; WEISLEDER, D. Fumonisin B₁: isolation from corn culture, and purification by high performance liquid chromatography. **Mycotoxin Research**, Mainz, v. 6, n. 2, p. 85-88, 1990.
73. VISCONTI, A.; DOKO, M.B.; SOLFRIZZO, M.; PASCALE, M.; BOENKE, A. European intercomparison study for the determination of fumonisins in maize. **Mikrochimica Acta**, Vienna, v. 123, n. 1-4, p. 55-61, 1996.
74. VOSS, K.A.; PLATTNER, R.D.; BACON, C.W.; NORRED, W.P. Comparative studies of hepatotoxicity and fumonisin B₁ and B₂ content of water and chloroform/methanol extracts of *Fusarium moniliforme* strain MRC 826 culture material. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 112, n. 2, p. 81-92, 1990.
75. WARE, G.M.; FRANCIS, O.; KUAN, S.S.; UMRIGAR, P.; CARMAN Jr., A.; CARTER, L.; BENNETT, G.A. Determination of fumonisin B₁ in corn by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytical Letters**, New York, v. 26, n. 8, p. 1751-1770, 1993.
76. WARE, G.M.; UMRIGAR, P.; CARMAN Jr., A.; KUAN, S.S. Evaluation of fumonitoxin immunoaffinity columns. **Analytical Letters**, New York, v. 27, n. 4, p. 693-715, 1994.
77. WILSON, T.M.; ROSS, P.F.; RICE, L.G. Fumonisin B₁ levels associated with an epizootic of equine leukoencephalomalacia. **Journal of Veterinary Diagnostics and Investigation**, Turlock, v. 2, n. 3, p. 213-216, 1990.
78. XIE, W.; MIROCHA, C.J.; CHEN, J. Detection of two naturally occurring structural isomers of partially hydrolyzed fumonisin B₁ in corn by on-line capillary liquid chromatography-fast atom bombardment mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, n. 4, p. 1251-1255, 1997.
79. YEUNG, J.M.; PRELUSKY, D.B.; SAVARD, M.E.; DANG, B.D.; ROBINSON, L.A. - Sensitive immunoassay for fumonisin B₁ in corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 11, p. 3582-3586, 1996.

Capítulo 2

OTIMIZAÇÃO DE CONDIÇÕES ANALÍTICAS NA DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS B₁ E B₂ EM MILHO E AVALIAÇÃO DE DUAS COLUNAS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA



OTIMIZAÇÃO DE CONDIÇÕES ANALÍTICAS NA DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS B₁ E B₂ EM MILHO E AVALIAÇÃO DE DUAS COLUNAS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

RESUMO

O método originalmente desenvolvido para a determinação de fumonisinas B₁ e B₂ em milho (SHEPHARD et alii, 1990) não apresentou resultados satisfatórios em nosso laboratório. A recuperação encontrada estava abaixo de 50% para fumonisina B₁, indicando a necessidade de otimização para nossas condições de trabalho. Em paralelo, foi realizada a comparação entre duas colunas comerciais de extração em fase sólida de troca aniônica forte necessárias para a execução do método. Mantendo a extração com metanol-água (3:1-v/v), o método foi modificado da seguinte forma: os volumes de solvente no condicionamento e lavagem da coluna de extração de troca aniônica forte foram aumentados para 10 mL e o volume e composição do solvente de eluição alterado para 20 mL de metanol-ácido acético glacial (95:5-v/v). Após estas modificações a recuperação elevou-se para a faixa de 93 a 96% para FB₁ e 69 a 85% para FB₂. O solvente de eluição por CLAE com detecção por fluorescência foi modificado para acetonitrila-água-ácido acético glacial (50:50:0,5-v/v/v) durante os primeiros 15 minutos com troca para acetonitrila pura até o final da corrida. As novas condições melhoraram os limites de detecção para 20 e 40 ng/g para FB₁ e FB₂, respectivamente, e o desvio padrão relativo para 5,8% para FB₁ e 13,4% para FB₂. As duas colunas comerciais de troca aniônica forte avaliadas mostraram que podem ser reutilizadas uma única vez.

Unitermos: Micotoxinas, Fumonisinas, Milho, Cromatografia líquida de alta eficiência, Colunas de extração.

INTRODUÇÃO

As investigações sobre a ocorrência de micotoxinas em alimentos e rações são de suma importância para que esforços possam ser concentrados na prevenção, no controle ou na detoxificação dos produtos susceptíveis a determinadas micotoxinas. Neste sentido e com vistas a garantir a confiabilidade dos resultados relativos à incidência de micotoxinas em alimentos, estudos visando escolher e aprimorar a metodologia para sua detecção e quantificação são, sem dúvida, necessários e urgentes (SYLOS & AMAYA, 1996).

As fumonisinas foram descobertas recentemente e sua existência foi primeiro relatada em 1988 por um grupo de pesquisadores da África do Sul (BEZUIDENHOUT et alii, 1988; GELDERBLUM et alii, 1988). São produzidas por cepas de *Fusarium moniliforme* Sheldon (THIEL et alii, 1992), *F. proliferatum* Seção Liseola (NELSON et alii, 1983) e *F. nygamai* (BURGESS & TRIMBOLI, 1986). O milho tem sido o cereal mais implicado em contaminação por fumonisinas, tanto em frequência como em níveis. Realmente, o *F. moniliforme* e o *F. proliferatum* são invasores freqüentes do milho em todo o mundo (BULLERMAN, 1996).

Originalmente, BEZUIDENHOUT et alii (1988) descreveram e caracterizaram quimicamente quatro metabólitos, as fumonsinas A₁ (FA₁), A₂ (FA₂), B₁ (FB₁) e B₂ (FB₂). Em 1992, duas outras fumonisinas, B₃ (FB₃) e B₄ (FB₄), foram isoladas a partir de cultivos de *F. moniliforme* MRC 826 (PLATTNER et alii, 1992). Mais recentemente as fumonisinas da série "C" (C₁, C₃ e C₄) foram isoladas de milho fungado por SEO & LEE (1999). A FB₁ é a mais importante do grupo, constituindo freqüentemente até 70% do total das fumonisinas, produzidas tanto em cultivos, quanto em milho naturalmente contaminado.

Estudos têm demonstrado que as fumonisinas causam várias doenças em animais: a leucoencefalomalácia em eqüinos (LEME) (KELLERMAN et alii, 1990; ROSS et alii, 1992),

edema pulmonar e hidrotórax em suínos (HARRISON et alii, 1990; COLVIN & HARRISON, 1992), hemorragia cerebral em coelhos (BUCCI et alii, 1996) e câncer hepático em ratos (GELDERBLUM et alii, 1991). As fumonisinas têm sido associadas com câncer de esôfago na região de Transkei na África do Sul (RHEEDER et alii, 1992), na região de Lixian na China (CHU & LI, 1994), nordeste da Itália (DOKO & VISCONTI, 1994) e em Charleston, sudeste dos Estados Unidos (SYDENHAM et alii, 1991). Nestas regiões o milho é importante na dieta da população, e os dados preliminares indicam que o milho destes locais têm apresentado uma concentração significativa de contaminação por fumonisinas. Com base nas informações toxicológicas disponíveis, a *Agência Internacional sobre Pesquisa do Câncer* (IARC) classificou as toxinas do *F. moniliforme*, incluindo as fumonisinas, como classe 2B, possivelmente carcinogênica para o homem (IARC, 1993).

Informações sobre a incidência de fumonisinas em milho e produtos à base de milho brasileiros são raras. No entanto, as existentes mostram a importância do problema para o nosso país. MEIRELES et alii (1992) estudaram 29 surtos de LEME nos anos de 1988-1990 nos Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Santa Catarina e Minas Gerais. Das mortes diagnosticadas, 82,4% estavam relacionadas com a ingestão de ração contaminada com FB₁. No trabalho realizado por SYDENHAM et alii (1992a), foram analisadas 21 amostras de ração associadas a casos de micotoxicoses na região de Londrina, Paraná. Os resultados revelaram que 95,2% continham FB₁ e 85,7% continham FB₂. Já HIROOKA et alii (1996) investigaram 48 amostras de milho provenientes do Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás, das safras de 1990-1991. Das amostras analisadas, 97,4% apresentavam-se positivas para FB₁ e 94,8% para FB₂. Um total de 4 amostras excederam a 10 µg/g, valor considerado crítico para o desencadeamento da LEME.

Devido ao amplo potencial de contaminação do milho e derivados com fumonisinas (PATEL et alii, 1997; SHEPHARD et alii, 1996; THIEL et alii, 1992; UENO et alii, 1993; ZOLLER et alii, 1994), métodos analíticos que monitorem os níveis de fumonisinas nos produtos agrícolas são de grande interesse. Este fato é reforçado pelas necessidades de fiscalização do cereal e seus produtos originados interna ou externamente. É também possível

que a escassez de informações sobre a incidência de fumonisinas no Brasil advenha exatamente das dificuldades encontradas no país com a metodologia analítica. Diante deste quadro os objetivos do presente trabalho foram: (1) otimizar e adequar o método de SHEPHARD et alii (1990) para as condições de trabalho encontrados em laboratórios brasileiros; (2) comparar duas colunas comerciais de extração em fase sólida de troca aniônica forte necessárias para a execução do método.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras: amostras de milho foram adquiridas em estabelecimentos comerciais de Campinas, São Paulo. As amostras foram trituradas em moinho até passarem por uma peneira de 200 mesh e acondicionadas em sacos plásticos impermeáveis à água. Foram mantidas a -18°C até o momento da análise.

Padrões de fumonisinas B₁ e B₂: o padrão de FB₁ foi obtido da CSIR Food Science and Technology (Pretoria – África do Sul) e de FB₂ da Sigma Chemical Company (St. Louis, Estados Unidos). As soluções estoque individuais de FB₁ e FB₂ foram preparadas pesando-se 0,001 g do padrão e dissolvendo-o em 10 mL de acetonitrila-água (1:1-v/v), segundo VISCONTI et alii (1994), obtendo-se uma concentração de 100 µg/mL. As soluções de trabalho foram de 25 e 50 µg/mL de FB₁+FB₂, respectivamente. Todas as soluções padrões foram armazenadas em frascos âmbar vedados, sob temperatura de -18°C .

Solventes e reagentes: acetonitrila grau cromatográfico, metanol, ácido acético glacial, ortoftaldialdeído (OPA), 2-mercaptoetanol, tetraborato de sódio, ácido clorídrico, hidróxido de sódio, fosfato de sódio, acetato de sódio. Todos os solventes e reagentes usados para a extração e limpeza foram de grau analítico.

Fase móvel: as fases móveis testadas foram filtradas através de uma membrana HVLP 01300 de 0,45 µm de diâmetro (Millipore Corporation, Milford, MA) e degaseificadas em banho de ultra-som. O fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min.

Reagente de derivação (OPA): dissolver 40 mg de o-ftaldialdeído em 1 mL de metanol e diluir com 5 mL de tampão borato de sódio 0,1 M (dissolver 3,8 g de tetraborato de sódio em 100 mL de água deionizada e corrigir o pH para 10,4 com hidróxido de sódio 0,1 M), adicionar 50 µL de 2-mercaptoetanol e misturar. Estocar em frasco âmbar vedado com papel alumínio sob temperatura de 5 a 15 °C. Estável por uma semana.

Equipamentos:

Cromatógrafo a líquido: bomba (Waters Associates, Milford, MA) com alça de injeção de 20 µL e um injetor tipo Rheodyne Inc. M-7125 (Cotati, CA). Detector de fluorescência HP 1046 A (Hewlett Packard, Avondale, PA) com comprimentos de onda de excitação e emissão de 335 e 440 nm e fenda espectral de 17 e 50 nm, respectivamente. Integrador HP 3393 A (Hewlett Packard, Avondale, PA). Coluna de fase reversa (250 mm x 4,6 mm) da Varian (Walnut Creek, CA) empacotada com Microsorb-MV 5 µm ODS. Coluna de guarda da Varian (Walnut Creek, CA) empacotada com C₁₈ ODS (Alltech Associates Inc., Deerfield, IL). Pré-coluna da Varian (Walnut Creek, CA) empacotada com sílica Sil-X-1 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT).

Liquidificador: comum, de uso doméstico ou equivalente.

Colunas de extração em fase sólida: cartuchos Bond-Elut LRC SAX, com capacidade de 10 mL contendo 500 mg de trimetilaminopropil (Varian, Harbor City, CA 90710) e cartuchos Sep Pak accell plus QMA (Waters Associates, Milford, MA).

Suporte múltiplo para colunas de extração em fase sólida: Supelco – Visiprep DL (Bellfonte, PA 16823) ou equivalente.

Centrífuga: centrifugador Excelsa Baby II modelo 206 R (Fanem) ou equivalente.

Moinho: modelo NEC 180-75-01 ou equivalente.

Banho ultra-som: Microsonic SX 20 ou equivalente.

Purificador de água: a água foi filtrada e deionizada através de um sistema de ultra-purificação de água Millipore Milli-Q plus (Millipore, Milford, MA).

Pipetas automáticas: Finnpiptette Digital de 40-200 μL e de 200-1000 μL (LabSystems) ou equivalentes.

Seringa: Microliter 710 de 100 μL (Hamilton Co, Reno, NA).

Otimização da separação cromatográfica das fumonisinas B₁ e B₂: fases móveis com diferentes composições foram avaliadas através da resolução das toxinas, com padrões e posteriormente com amostras artificialmente contaminadas com 2 $\mu\text{g/g}$ de FB₁ e FB₂.

Avaliação de sistemas de extração e limpeza: o método de SHEPHARD et alii (1990) foi avaliado quanto a sua eficiência usando-se amostras de milho artificialmente contaminadas. A concentração de FB₁ e FB₂ nas amostras enriquecidas de milho foi de 2 $\mu\text{g/g}$.

Avaliação de colunas de extração em fase sólida: as colunas de troca aniônica forte de 500 mg, Sep Pak QMA (Waters Associates, Milford, MA) e SAX (Varian, Harbor City, CA 90710) foram avaliadas quanto à eficiência de limpeza e quanto à recuperação de FB₁ e FB₂ em amostras de milho artificialmente contaminadas realizando a alteração dos seguintes parâmetros: volume das soluções de lavagem, força iônica e volume da solução de eluição, e fluxo sob ação da gravidade e vácuo.

Foi avaliada também a capacidade de reutilização das colunas de extração. A regeneração das colunas de troca aniônica forte foi realizada após tratamento com 5 mL de ácido clorídrico 0,1 M e em seguida por 8 mL de água destilada, segundo SYDENHAM et alii (1992b).

Recuperação, repetibilidade e limites de detecção: vários aspectos com relação a técnica analítica foram avaliados, incluindo a recuperação de cada fumonisina individualmente, a linearidade da curva padrão, o limite de detecção do método e a repetibilidade da técnica. Para a recuperação, 50 g da amostra de milho, livre de fumonisinas, foram contaminadas com 2 µg/g dos padrões de FB₁ e FB₂. A linearidade da curva padrão foi determinada pela análise cromatográfica de padrões diluídos em concentrações decrescentes e submetidos a reação com o o-ftaldialdeído. O limite de detecção do método foi definido para nossas condições de trabalho, como a concentração das fumonisinas B₁ e B₂ presente na amostra que originou um pico com uma área de 1×10^5 mV. Esta área foi escolhida por ser a menor que permitia visualização inequívoca do pico. A repetibilidade do método foi avaliada calculando-se o desvio padrão relativo (RSD) do resultado da análise de 4 amostras de milho contaminadas artificialmente com 2 µg/g de FB₁ e FB₂.

Descontaminação do material: todo o material utilizado foi descontaminado com uma solução concentrada de hipoclorito de sódio comercial, por 24 horas. Após a descontaminação o material foi lavado normalmente, enxaguado com água destilada e seco em estufa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Otimização das condições de detecção no cromatógrafo a líquido: com o objetivo de utilizar o cromatógrafo a líquido com sistema de detecção por espectrometria ultra-violeta/visível (UV/VIS), por ser um detector com menor custo e disponível nos laboratórios nacionais, avaliou-se a quantidade necessária de FB₁ capaz de ser detectada após derivação com OPA, conforme mostra a Tabela 6.

Tabela 6 - Detecção e tempo de retenção do derivado FB₁-OPA em diferentes proporções de metanol-tampão fosfato pH 3,3 como fase móvel.

Metanol-tampão fosfato (v/v)	FB ₁ (µg/mL)	Detecção	Tempo de retenção (min)
70:30	200	-	-
	400	-	-
	600	+	3,99
75:25	200	-	-
	400	+	3,72
	600	+	3,61
80:20	200	+	3,28
	400	+	3,29
	600	+	3,29

Nota-se que o limite de detecção estaria próximo de 200 µg/mL, ou seja, 20 µg/g conforme a extração e limpeza do método de SHEPHARD et alii (1990). Além deste fator, o tempo de retenção encontrado estaria dentro de uma região onde há interferentes provenientes da extração do milho. Portanto, a análise de FB₁ por CLAE com detecção UV/VIS não se mostrou adequada.

Em virtude do problema acima, a determinação das fumonisinas foi realizada através do detector de fluorescência conforme modificações citadas por CAMARGOS et alii (no prelo): uso de 100 µL do padrão ou extrato e 200 µL de reagente OPA. A reação de derivação ocorre sob agitação de 30 segundos à temperatura entre 5 a 15°C e injeção no cromatógrafo a 60 segundos do início da reação. Para a detecção por fluorescência foi utilizado um comprimento de onda de excitação de 335 nm e de emissão de 440 nm.

Otimização das condições de eluição no cromatógrafo a líquido: várias fases móveis foram estudadas para separar os derivados de fumonisinas-OPA das impurezas resultantes da derivação ou de interferentes provenientes do extrato da amostra em cromatógrafo a líquido.

A melhor resolução para o pico de FB₁ foi conseguida com acetonitrila-água-ácido acético glacial (50:50:0,5-v/v/v) como fase móvel. Com a fase móvel escolhida, o tempo de retenção da FB₁ foi de 10,1 e o da FB₂ de 42,6 minutos. O tempo de retenção excessivamente longo para FB₂ recomenda a utilização de uma coluna mais curta, possivelmente com 15 cm de comprimento. Para obter um tempo de retenção menor para a FB₂, na coluna de 25 cm em uso neste estudo, o sistema solvente foi mudado para acetonitrila pura após 15 minutos da injeção da amostra. Com esta modificação, o tempo de retenção da FB₂ foi reduzido para 26 minutos. Antes da injeção da nova amostra, um tempo para reequilibrar a coluna de 30 minutos com acetonitrila-água-ácido acético glacial (50:50:0,5-v/v/v), tornou-se necessário. A demora na saída da FB₂ tem sido resolvida em alguns laboratórios com o uso de gradientes (MUSSER & PLATTNER, 1997; ROSS et alii, 1991; ZOLLER et alii, 1994). A Tabela 7 apresenta as fases móveis avaliadas, algumas citadas na literatura.

Os cromatogramas das soluções padrão de 50 µg/mL de FB₁ e FB₂ e do extrato de milho naturalmente contaminado estão apresentados nas Figuras 7 e 8.

Avaliação de sistemas de extração e limpeza: o método de SHEPHARD et alii (1990) mostrou recuperações inferiores a 50% das fumonisinas adicionadas em amostras de milho. Por este motivo modificações na fase de limpeza com coluna de troca aniônica forte (500 mg) foram introduzidas no sentido de otimizá-lo.

Avaliação da coluna de extração em fase sólida de troca aniônica forte: a limpeza com as colunas de troca aniônica forte não produziu bons resultados uma vez que retinha 60% de FB₁. Apesar da aparente simplicidade, a separação por troca iônica pode ser complexa. A retenção ou a eluição das fumonisinas pelas colunas de troca aniônica forte utilizadas na etapa de limpeza pode ser afetada por fatores como pH, força iônica e vazão de eluição (SYDENHAM et alii, 1992b; THIEL et alii, 1993). O pH do extrato deve ser sempre corrigido para 5,8-6,5 segundo

todos os autores pois a recuperação das fumonisinas pode ser comprometida em valores de pH abaixo de 5,8 e, por outro lado, as fumonisinas podem ser completamente ionizadas em pH acima de 7, devido aos grupos carboxílicos, presentes na molécula, além deste pH possibilitar a co-extração de compostos interferentes polares. Os sistemas solventes utilizados com coluna de troca aniônica forte, neste trabalho estão descritos na Tabela 8.

Tabela 7 - Tempo de retenção em cromatografia a líquido de alta eficiência para FB₁ em diferentes fases móveis.

Fase móvel (v/v ou v/v/v)	Tempo de retenção para FB ₁ (min)	Referência
Acetonitrila-água-ácido acético glacial (50:50:0,5)	10,13	STACK & EPPLEY (1992)
Acetonitrila-água-ácido acético glacial (50:50:1)	8,30	
Acetonitrila-água-ácido acético glacial (51:49:0,5)	10,50	
Acetonitrila-água-ácido acético glacial (51:49:0,1)	2,90	
Acetonitrila-água-ácido acético glacial (51:49:0,3)	8,72	
Acetonitrila-água-ácido acético glacial (52:48:1)	10,02	
Acetonitrila-água-ácido acético glacial (53:47:1)	8,22	
Acetonitrila-água-ácido acético glacial (54:46:1)	12,71	
Acetonitrila-água-ácido acético glacial (54,5:45,5:1)	6,08	
Acetonitrila-água-ácido acético glacial (55:45:1)	6,30	
Acetonitrila-água-ácido acético glacial (56:44:1)	6,78	RICE & ROSS (1994)
Acetonitrila-água-ácido acético glacial (57:43:1)	8,22	
Acetonitrila-água-ácido acético glacial (60:40:1)	4,88	
Acetonitrila-água-ácido acético glacial (70:30:0,5)	4,39	
Acetonitrila-tampão fosfato 0,05M pH 3,35 (30:70)	3,18	
Acetonitrila-tampão fosfato 0,1M pH 3,35 (40:60)	2,87	
Acetonitrila-tampão fosfato 0,1M pH 3,35 (50:50)	2,11	
Acetonitrila-metanol-tampão fosfato 0,1M pH 3,35 (35:35:30)	2,92	
Acetonitrila-metanol-tampão fosfato 0,1M pH 3,35 (30:40:30)	3,12	
Metanol-tampão fosfato 0,1 M pH 3,35 (77:23)	3,40	SYDENHAM et alii (1992b) ZOLLER et alii (1994)
Metanol-tampão acetato 0,1 M pH 3,35 (50:50)	4,80	
Metanol-tampão acetato 0,1 M pH 3,35 (80:20)	2,75	
Metanol-tampão acetato 0,1 M pH 3,35 (65:35)	3,23	
Metanol-água-ácido acético glacial (77:23:1)	7,55	

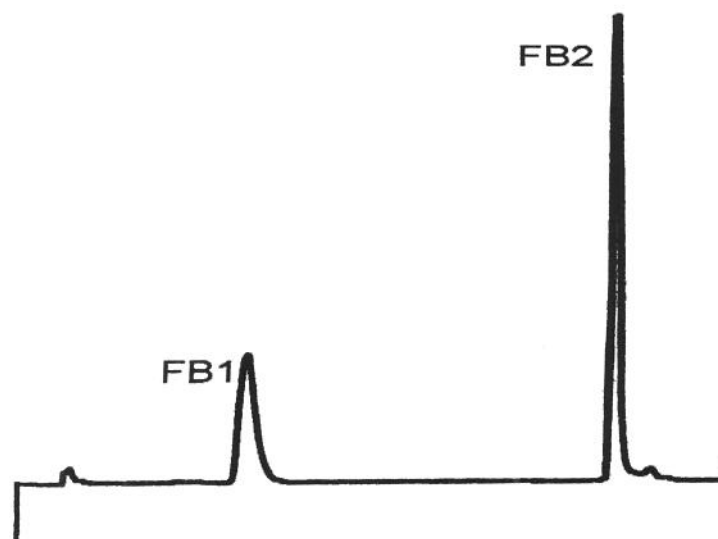


Figura 7 - Cromatograma das fumonisinas B₁ e B₂. Condições cromatográficas: coluna (250 mm x 4,6 mm) Varian (Walnut Creek, CA) empacotada com Microsorb-MV 5 µm ODS de fase reversa; fase móvel composta por acetonitrila-água-ácido acético glacial (50:50:0,5-v/v/v) até 15 minutos, seguida por acetonitrila pura; comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 nm e 440 nm; fluxo de 1,0 mL/min.

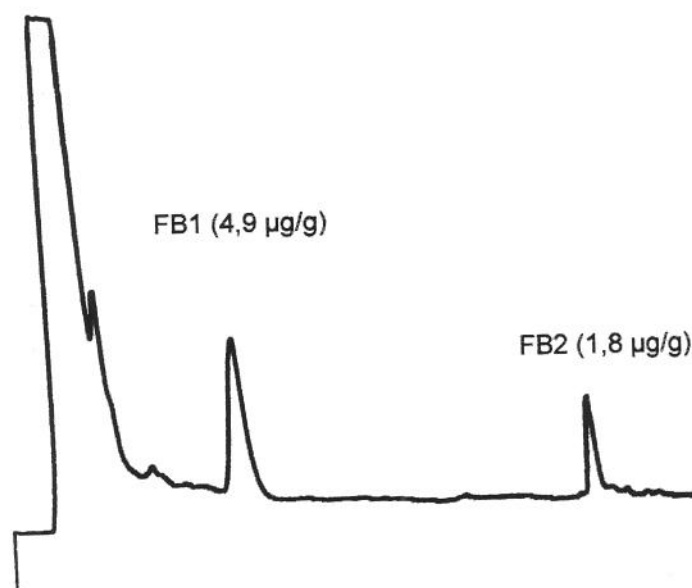


Figura 8 - Cromatograma de amostra de milho naturalmente contaminada com FB₁ e FB₂. Condições cromatográficas: coluna (250 mm x 4,6 mm) Varian (Walnut Creek, CA) empacotada com Microsorb-MV 5 µm ODS de fase reversa; fase móvel composta por acetonitrila-água-ácido acético glacial (50:50:0,5-v/v/v) até 15 minutos, seguida por acetonitrila pura; comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 nm e 440 nm; fluxo de 1,0 mL/min.

Tabela 8 - Solventes testados com colunas de troca aniônica forte para limpeza de extratos de milho na determinação de fumonisinas.

Condicionamento da coluna	Aplicação da amostra	Lavagem da coluna	Eluição das toxinas	Referências
5 mL metanol	1 mL em metanol-água (3:1)	6 mL metanol-água (3:1)	10 mL metanol-ácido acético (99,5:0,5)	UENO et alii (1993)
5 mL de metanol	10 mL em metanol-água (3:1)	5 mL metanol-água (3:1)	10 mL metanol-ácido acético (99:1)	SHEPHARD et alii (1990)
5 mL metanol/água (3:1)		3 mL metanol		
8 mL metanol	5-15 mL em metanol-água (3:1)	8 mL metanol-água (3:1)	10 mL metanol-ácido acético (99:1)	ZOLLER et alii (1994)
8 mL metanol-água (3:1)		5 mL metanol		

Em todas as misturas de metanol-água recomenda-se manter o pH entre 5,8 e 6,5.

O condicionamento das colunas foi otimizado alterando-se os seguintes parâmetros: volume das soluções de lavagem, força iônica, volume da solução e vazão de eluição. O aumento da força iônica, ou seja, metanol-ácido acético glacial (99:1-v/v) para (95:5-v/v) aumentou a recuperação das fumonisinas (Figura 9). Além disso, o uso de solvente com maior força iônica não resultou na co-eluição de compostos intrínsecos do milho que interfeririam com a determinação cromatográfica das fumonisinas. Adicionalmente, com o aumento da quantidade de eluente para 20 mL (Figura 10) conseguiu-se recuperações de 72 a 87% de FB₁ e de 51 a 78% de FB₂ em coluna Sep Pak[®] QMA e de 93 a 96% de FB₁ e de 69 a 85% de FB₂ em colunas SAX[®] nas duas primeiras utilizações (Tabela 9). Já foi relatado que a recuperação das fumonisinas é substancialmente menor quando a vazão de eluição nas colunas está entre 2,5 a 6,7 mL/minuto, recomendando-se vazões iguais ou menores que 1 mL/min (SYDENHAM et alii, 1992b). A necessidade de manter estas condições de eluição foram constatadas no presente trabalho, onde uma vazão de 2 mL/min reduziu a recuperação de FB₁ para 24%.

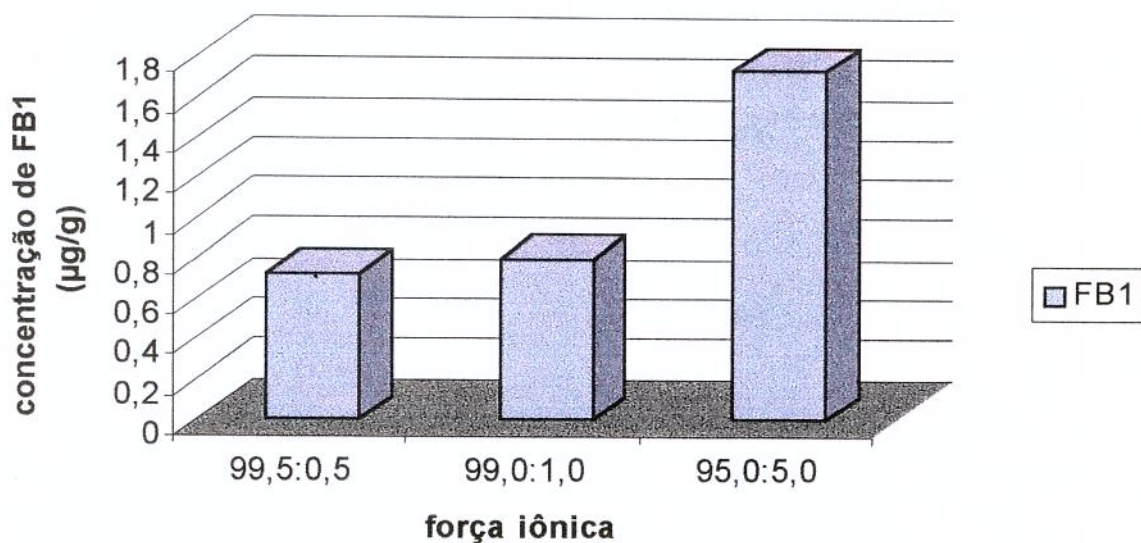


Figura 9 - Concentração de FB₁ em amostra de milho enriquecida (2 µg/g) obtida após eluição com solventes de força iônica diferente em coluna de extração de troca aniônica forte.

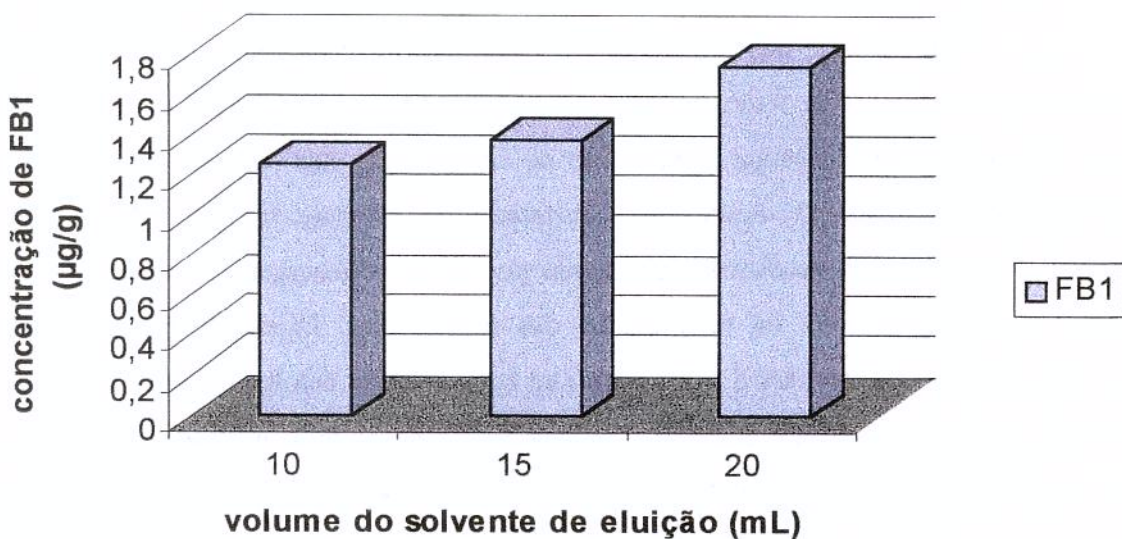


Figura 10 - Concentração de FB₁ em amostra de milho enriquecida (2 µg/g) obtida com diferentes volumes do solvente de eluição (metanol-ácido acético glacial, 95:5-v/v) utilizado em colunas de extração de troca aniônica forte.

Tabela 9 - Recuperação das fumonisinas adicionadas a milho quando são usadas colunas de extração em fase sólida de troca aniônica forte de diferentes marcas em mais de uma utilização por coluna.

Marca da coluna	Fumonisinas	Recuperação (%)		
		1º uso	2º uso	3º uso
Sep Pak®	FB ₁	87	82	39
		86	72	
		80	73	
		77	73	
			75	
	FB ₂	78	59	22
		78	51	
			62	
			60	
SAX®	FB ₁	96	94	62
		96	93	70
		95		
		96		
	FB ₂	70	84	56
		69	85	62
		72		

Nível de adição por fumonisina = 2 µg/g

A regeneração das colunas de troca aniônica forte foi realizada com 5 mL de ácido clorídrico 0,1 M seguidos de 8 mL de água destilada, segundo SYDENHAM et alii (1992b). Os autores não verificaram diferença significativa na recuperação das fumonisinas antes e após a regeneração das colunas. O mesmo foi constatado no presente trabalho (Tabela 9). Estes resultados sugerem que se necessário, as colunas podem ser regeneradas e reutilizadas mais uma vez sem queda significativa na recuperação das fumonisinas. Existe diferença tanto para a recuperação da FB₁ quanto para a FB₂ quando se comparam os resultados entre as duas colunas de limpeza, conforme a Tabela 9, onde a coluna SAX® apresentou melhor resultado do que a coluna Sep Pak®. No entanto, UENO et alii (1993) observaram que a quantidade de FB₂ recuperada em amostras cuja etapa de limpeza foi realizada com colunas Sep Pak® QMA foi maior que em colunas SAX®, contrariando os resultados observados neste trabalho.

Recuperação, repetibilidade e limites de detecção: a recuperação do método otimizado foi de 93 a 96% para FB₁ e de 69 a 85% para FB₂. No estudo colaborativo do método de SHEPHARD et alii (1990) conduzido por AOAC-IUPAC (SYDENHAM et alii, 1996), os 12 laboratórios envolvidos obtiveram recuperações de 81 a 84% para FB₁ e 76 a 82% para FB₂. Já os resultados com laboratórios europeus, em estudo em que a metodologia era de livre escolha, as recuperações médias foram 70% para FB₁ e 69% para FB₂ (VISCONTI et alii, 1996). Segundo ALBERTS et alii (1992) as recuperações mais baixas obtidas para FB₂ podem ser devido a diferença de polaridade em relação a FB₁ que resulta em uma perda de aproximadamente 20% durante a etapa de limpeza, em comparação com os 4% para FB₁. As curvas padrão para FB₁ e FB₂ foram lineares de 20 a 10000 ng/g e de 40 a 10000 ng/g, respectivamente, conforme apresentado na Figura 11.

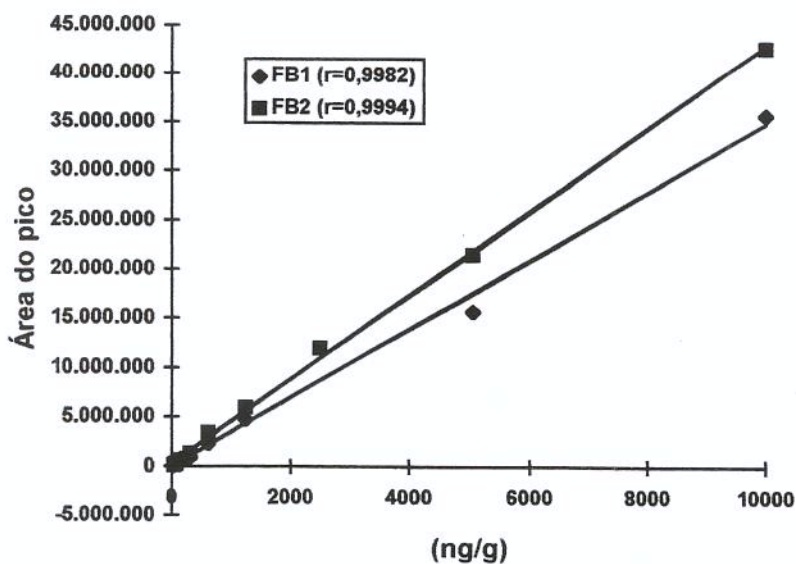


Figura 11 - Curvas padrão de FB₁ e FB₂.

Os limites de detecção do método foram de 20 e 40 ng/g para FB₁ e FB₂, respectivamente. SHEPHARD (1998) revendo a literatura sobre o assunto relatou como usual um limite de detecção da ordem de 50 ng/g para FB₁ e FB₂. A repetibilidade do método mostrou-se adequada com desvios padrões relativos (RSD) de 5,8% para FB₁ e 13,4% para FB₂ (Tabela 10). Resultados estes que comparam-se bem com os encontrados no estudo colaborativo AOAC-IUPAC (SYDENHAM et alii, 1996) onde os RSD internos dos laboratórios variaram entre 5,8% a 13,2% para FB₁ e entre 7,2 e 17,5% para FB₂. No estudo europeu (VISCONTI et alii, 1996), os valores médios de RSD foram de 10% para FB₁ e 11% para FB₂.

Tabela 10 - Resultados de precisão para FB₁ e FB₂ em amostras de milho enriquecida com 2 µg/g de FB₁+FB₂.

FB ₁ e FB ₂ adicionada (µg/g)	FB ₁ encontrada (µg/g)	FB ₂ encontrada (µg/g)
2	1,60	1,55
2	1,54	1,18
2	1,74	1,24
2	1,72	1,20
Média	1,65	1,29
Desvio padrão	0,096	0,17
RSD (%)	5,81	13,42

CONCLUSÕES

O método de SHEPHARD et alii (1990) sofreu algumas modificações para aumentar a recuperação das toxinas e melhorar o limite de detecção. Observou-se que o aumento do volume de solventes e da força iônica na eluição das fumonisinas, juntamente com o fluxo inferior a 1 mL/minuto na etapa de limpeza para coluna de extração de troca aniônica forte, melhorou a recuperação da análise.

As duas colunas comerciais avaliadas mostraram que podem ser reutilizadas uma única vez, no entanto os resultados pela coluna SAX[®] foram mais satisfatórios tanto para FB₁ quanto para FB₂ do que os resultados apresentados pela coluna Sep Pak[®] QMA.

A fase móvel composta por acetonitrila-água-ácido acético glacial (50:50:0,5-v/v/v) durante os primeiros 15 minutos e troca para acetonitrila pura até o final da corrida mostrou-se adequado para as análises cromatográficas de fumonisinas em milho.

O método otimizado mostrou-se sensível (limite de detecção = 20 e 40 ng/g, respectivamente para FB₁ e FB₂), preciso (RSD = 5,8 e 13,4%, respectivamente para FB₁ e FB₂) e exato (recuperações médias de 95 e 76% para FB₁ e FB₂, respectivamente em coluna SAX[®]).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ALBERTS, J.F., GELDERBLOM, W.C.A., MARASAS, W.F.O. Evaluation of the extraction and purification procedures of the maleyl derivatization HPLC technique for the quantification of the fumonisin B mycotoxins in corn cultures. **Mycotoxin Research**, Mainz, v. 8, n. 1, p. 2-12, 1992.
02. BEZUIDENHOUT, S.C., GELDERBLOM, W.C.A., GORST-ALLMAN, C.P., HORAK, R.M., MARASAS, W.F.O., SPITELLER, G., VLEGGARR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, Cambridge, v.11, p. 743-745, 1988.
03. BUCCI, T., HANSEN, D.K., LABORDE, J.B. Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin Fumonisin B₁. **Natural Toxins**, New York, v. 4, n. 1, p. 51-52, 1996.
04. BULLERMAN, L.B. Occurrence of *Fusarium* and fumonisins on food grains and in foods. In: JACKSON, L.S.; DEVRIES, J.W.; BULLERMAN, L.B. (eds). **Fumonsins in Food**. New York: Plenum Press, 1996, pp. 27 – 38.
05. BURGESS, L.W., TRIMBOLI, D. Characterization and distribution of *Fusarium nygamai*, sp. **Mycologia**, New York, v. 78, p. 223-229, 1986.

06. CAMARGOS, S.M., MACHINSKI Jr., M., SOARES, L.M.V. Avaliação de métodos para determinação de fumonisinas B₁ e B₂ em milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, no prelo.
07. CHU, F.S., LI, G.Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidence of esophageal cancer. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 3, p. 847-852, Mar. 1994.
08. COLVIN, B.M., HARRISON, L.R. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, n. 1-2, p. 79-82, 1992.
09. DOKO, M.B., VISCONTI, A. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 11, n. 4, p. 433-439, 1994.
10. GELDERBLUM, W.C.A., JASKIEWICZ, K., MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G., HORAK, R.M., VLEGGARR, R., KRIEK, N.P.J. Fumonisins – novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 7, p. 1806-1811, July 1988.
11. GELDERBLUM, W.C.A., KRIEK, N.P.J., MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁, in rats. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 12, n. 7, p. 1247-1251, 1991.
12. HARRISON, L.R., COLVIN, B.M., GREENE, J.T., NEWMAN, L.E., COLE, J.R. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Turlock, v. 2, n. 3, p. 217-221, 1990.
13. HIROOKA, E.Y., YAMAGUCHI, M.M., AOYAMA, S., SUGIURA, Y., UENO, Y. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 2, p. 173-183, Feb-Mar. 1996.
14. IARC, Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, vol 56, Lyon: IARC, 1993.
15. KELLERMAN, T.S., MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G., GELDERBLUM, W.C.A., CAWOOD, M.E., COETZER, J.A.W., Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B₁. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Onderstepoort, v. 57, n. 4, p. 269-275, 1990.
16. MEIRELES, M.C.A., CORREA, B., FISCHMAN, O., GAMBALE, W., PAULA, C.R., FONSECA, H. Leucoencefalomalácia equina (LEME) no Brasil. II. Aspectos

microbiológicos e micotoxicológicos dos surtos ocorridos nos anos de 1988 a 1990. **Anais...**, VII Encontro Nacional de Micotoxinas, São Paulo, p. 18, 1992.

17. MUSSER, S.M., PLATTNER, R.D. Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium nygamai*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, n. 4, p. 1169-1173, 1997.
18. NELSON, P.E., TOUSSOUN, T.A., MARASAS, W.F.O. **Fusarium species. An illustrated manual for identification**. State College: Pa., 1983, 203 p.
19. PATEL, S., HAZEL, C.M., WINTERTON, A.G.M., GLEADLE, A.E. Surveillance of fumonisins in UK maize-based foods and other cereals. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 14, n. 2, p. 187-191, 1997.
20. PLATTNER, R.D., WEISLEDER, D., SHACKELFORD, D.D., PETERSON, R., POWELL, R.G. A new fumonisin from solid cultures of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, p. 23-28, 1992.
21. RHEEDER, J.P., MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G., SYDENHAM, E.W., SHEPHARD, G.S., van SCHALKWYK, D.J. *Fusarium moniliforme* and the fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, n. 3, p. 353-357, 1992.
22. RICE, L.G., ROSS, P.F. Methods for detection and quantitation of fumonisins in corn, cereal, cereal products and animal excreta. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 57, n. 6, p. 536-540, June 1994.
23. ROSS, P.F., RICE, L.G., OSWEILER, G.D., NELSON, P.E., RICHARD, J.L., WILSON, T.M. A review and update of animal toxicoses associated with fumonisin-contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, n. 1-2, p. 109-114, 1992.
24. ROSS, P.F., RICE, L.G., PLATTNER, R.D., OSWEILER, G.D., WILSON, T.M., OWENS, D.L., NELSON, H.A., RICHARD, J.L. Concentration of fumonisin B₁ in feeds associated with animal health problems. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 114, n. 3, p. 129-135, 1991.
25. SEO, J.A., LEE, Y.W. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 3, p. 1331-1334, Mar. 1999.
26. SHEPHARD, G.S. Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 815, n. 1, p. 31-39, 1998.
27. SHEPHARD, G.S., SYDENHAM, E.W., THIEL, P.G., GELDERBLUM, W.C.A. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid

chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, New York, v. 13, n. 10, p. 2077-2087, Oct. 1990.

28. SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., STOCKENSTRÖM, S., SYDENHAM, E.W. Worldwide survey of fumonisin contaminated of corn and corn-based products. **Journal of AOAC International**, Arlington, v.79, n. 3, p. 671-687, 1996.
29. STACK, M.E., EPPLEY, R.M. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn products. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 75, n. 5, p. 834-837, 1992.
30. SYDENHAM, E.W., MARASAS, W.F.O., SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., HIROOKA, E.Y. Fumonisin concentration in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, p. 994-997, 1992a.
31. SYDENHAM, E.C., SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂, and B₃ in foods and feeds. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 75, n. 2, p. 313-318, 1992b.
32. SYDENHAM, E.C., SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O., STOCKENSTRÖM, S. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, n. 11, p. 2014-2018, 1991.
33. SYDENHAM, E.C., SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., STOCKENSTRÖM, S., SNIJMAN, P.W., van SCHALKWYK, D.J. Liquid Chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in corn: AOAC-IUPAC collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 79, n. 3, p. 688-696, 1996.
34. SYLOS, C.M., AMAYA, D.R. Estudo comparativo de métodos para determinação de aflatoxina M₁. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 56, n. 1, p. 87-97, 1996.
35. THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O., SYDENHAM, E.W., SHEPHARD, G.S., GELDERBLOM, W.C.A. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, n. 1-2, p. 3-9, 1992.
36. THIEL, P.G., SYDENHAM, E.C., SHEPHARD, G.S., Van SCHALKWYK, D.J. Study of the reproducibility characteristics of a Liquid Chromatographic method for the determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn: IUPAC collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 76, n. 2, p. 361-366, 1993.
37. UENO, Y., AOYAMA, S., SUGIURA, Y., WANG, D.S., LEE, U.S., HIROOKA, E.Y., HARA, S., KARKI, T., CHEN, G., YU, S.Z. A limited survey of fumonisins in corn and

corn-based products in Asian countries. **Mycotoxin Research**, Mainz, v. 9, n. 1, p. 27-34, 1993.

38. VISCONTI, A., BOENKE, A., SOLFRIZO, M., PASCALE, M., DOKO, M.B. European intercomparison study for the determination of fumonisins in maize. **Mikrochimica Acta**, Vienna, v. 123, p. 55-61, 1996.
39. VISCONTI, A., DOKO, M.B., BOTTALICO, C., SCHURER, B., BOENKE, A. Stability of fumonisins (FB₁ and FB₂) in solution. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 11, n. 4, p. 427-431, 1994.
40. ZOLLER, O., SAGER, F., ZIMMERLI, B. Vorkommen von fumonisin in Lebensmitteln. **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, Bern, v. 85, n. 1, p. 81-99, 1994.

Capítulo 3

OCORRÊNCIA DE FUMONISINAS B₁ E B₂ EM 3 HÍBRIDOS DE MILHO CULTIVADOS NO BRASIL E SUA RELAÇÃO COM A MICOFLORA, CONDIÇÕES AMBIENTAIS, ÉPOCA DE CULTIVO E LOCAL DE PLANTIO

OCORRÊNCIA DE FUMONISINAS B₁ E B₂ EM 3 HÍBRIDOS DE MILHO CULTIVADOS NO BRASIL E SUA RELAÇÃO COM A MICOFLORA, CONDIÇÕES AMBIENTAIS, ÉPOCA DE CULTIVO E LOCAL DE PLANTIO

RESUMO

A ocorrência natural de fumonisinas B₁ (FB₁) e B₂ (FB₂) foi avaliada em três híbridos de milho (*Zea mays* L.), com diferenças no comprimento do ciclo vegetativo, cultivados na safra agrícola 1994/1995 em 4 locais do Estado de São Paulo (6 amostras de Assis, 15 amostras de Capão Bonito, 18 amostras de Ribeirão Preto e 9 amostras de Votuporanga), Brasil. Todos os híbridos analisados mostraram uma contaminação por FB₁ e FB₂, variando de 0,23 a 15,96 µg/g e de 0,13 a 7,01 µg/g, respectivamente. Não houve correlação entre concentração de fumonisinas e comprimento do ciclo vegetativo, e nem com a presença de *Fusarium* spp.. Na análise geral dos dados, os efeitos de local, híbridos e híbrido x local foram altamente significativos. As diferentes épocas de cultivo foram avaliadas em um subconjunto de 2 locais (Capão Bonito e Ribeirão Preto), as épocas de safra normal apresentaram níveis de fumonisinas significativamente maiores que o milho de plantio tardio. Houve uma diferença significativa nos níveis de contaminação das amostras de milho desenvolvidas durante os meses de altas temperaturas e período chuvoso em relação ao milho desenvolvido no período de baixas temperaturas e período de seca. Os dados do presente estudo sugerem que as condições ambientais e época de plantio possuem um papel importante na quantidade de fumonisinas em milho. Quarenta amostras (83,33%) apresentaram níveis de fumonisinas acima de 1 µg/g. Estes resultados estão dentre os mais elevados já relatados a nível mundial, sugerem a necessidade de proteção à saúde da população através da fiscalização dos produtos de milho assim como estudos que indiquem meios de redução da contaminação.

Unitermos: Fumonisinas, Milho, Ocorrência.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos principais cereais cultivados no Brasil e o Estado de São Paulo foi responsável por 10,6% da produção nacional de 1998 (IBGE, 1999). A maior utilização do milho é em ração animal, onde este participa com até 63% na formulação de rações para aves e com até 75% para as de suínos (NOGUEIRA Jr. et alii, 1987).

O *Fusarium moniliforme* Sheldon é uma das espécies de *Fusarium* prevalentes de milho em vários países (BOTTALICO et alii, 1995; BULLERMAN & TSAI, 1994; CHULZE et alii, 1996; LESLIE et alii, 1992; MUNIMBAZI & BULLERMAN, 1996; NELSON et alii, 1991; RAMIREZ et alii, 1996; RHEEDER et alii, 1990; RHEEDER et alii, 1995; ROSS et alii, 1990; VISCONTI & DOKO, 1994), incluindo o Brasil (POZZI et alii, 1995). GELDERBLOM et alii (1988) e BEZUIDENHOUT et alii (1988) isolaram e caracterizaram as fumonisinas (B₁, B₂, B₃, B₄, A₁ e A₂), uma nova classe de micotoxinas, obtidas de culturas de cepas de *Fusarium moniliforme* isoladas da região de Transkei, África do Sul. Outras espécies como *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg, *F. subglutinans* (Wollen & Runking) Nelson, Toussoun & Marasas, *F. nygamai*, *F. napiforme*, *F. anthophilum* e *F. dlamini* (NELSON et alii, 1991) também produzem estas micotoxinas. Recentemente, a fumonisina B₁ (FB₁) foi produzida em culturas de *Alternaria alternata* f. sp. *lycorpersici* (CHEN et alii, 1992).

As fumonisinas, principalmente a FB₁, têm sido relacionadas com várias micotoxicoses em animais como: a leucoencefalomalácia equina (LEME) (MARASAS et alii, 1988; WILSON et alii, 1992) e síndrome do edema pulmonar em suínos (SEPS) (COLVIN & HARRISON, 1992; HARRISON et alii, 1990; HASCHEK et alii, 1992). Em experimentos com animais de laboratório, GELDERBLOM et alii (1991) observaram o aumento da incidência de carcinoma hepatocelular em ratos alimentados com 50 µg/g de FB₁ adicionada em rações e BUCCI et alii (1996) demonstraram que uma dose diária de 1,75 µg/g de FB₁ causou leucoencefalomalácia e hemorragia em cérebro de coelhos. Em humanos está associada com risco de câncer de esôfago (CE), onde estudos epidemiológicos realizados na África do Sul

(SYDENHAM et alii, 1990b; RHEEDER et alii, 1992), China (CHU & LI, 1994; YOSHIZAWA et alii, 1994), Itália (DOKO & VISCONTI, 1994; FRANCHESCHI et alii, 1990) e Estados Unidos (SYDENHAM et alii, 1991) mostraram que a FB₁ estava presente naturalmente no milho da dieta de várias populações de alto risco de CE, mas não há uma prova experimental da relação causa e efeito. A ingestão contínua de milho naturalmente contaminado com fumonisinas ainda não está bem conhecida (CASTEGNARO & WILD, 1995). Com isso, a *Agencia Internacional sobre Pesquisa do Câncer* (IARC) classificou as “toxinas de *F. moniliforme*” como classe 2B, possivelmente carcinogênicas para humanos (IARC, 1993). Além disso, há um risco para a população consumidora de milho e seus derivados devido a ocorrência de fumonisinas nestes produtos ter sido demonstrada em vários países do mundo conforme a revisão realizada por SHEPHARD et alii (1996) e sementes sem sintomas podem estar altamente contaminadas com fumonisinas (Le BARS et alii, 1994 e RHEEDER et alii, 1995).

Quanto as condições ambientais, o *F. moniliforme* é descrito como um fungo predominante em regiões secas e de clima temperado em relação às regiões frias como o Norte Europeu e o Canadá (MILLER, 1995). Ademais, KING & SCOTT (1981) e HEADRICK & PATAKY (1991) demonstraram que há linhagens de milho com possibilidade real de resistência ao fungo. Assim, a seleção de híbridos com baixa suscetibilidade a infecção fúngica é atualmente considerado um meio promissor para diminuir o risco de contaminação por fumonisinas (PASCALE et alii, 1997).

O presente artigo relata a ocorrência de FB₁ e FB₂ em 3 híbridos de milho (BR 201, Cargill 901 e Contimax 322) plantadas em diferentes épocas em 4 locais do Estado de São Paulo (Assis, Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga), Brasil. Características específicas como a duração do ciclo vegetativo dos híbridos de milho, local e época de plantio, condições ambientais e microbiota fúngica, foram avaliadas com relação a sua possível influência na produção de fumonisinas nos híbridos estudados.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Um total de 48 amostras de híbridos de milho foram colhidas em 4 estações experimentais do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), localizadas no Estado de São Paulo, Brasil, na safra 1994/1995. Seis amostras foram coletadas em Assis, quinze, dezoito e nove foram provenientes de Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, respectivamente.

Foram escolhidos 3 tipos de híbridos disponíveis comercialmente segundo a duração do ciclo vegetativo, ou seja, o período compreendido entre o plantio e o florescimento da espiga. O híbrido duplo BR 201 (Sementes Mogiana) apresenta ciclo precoce, o híbrido simples Cargill 901 (Sementes Cargill) apresenta ciclo super-precoce e o híbrido triplo Contimax 322 (Zêneca) apresenta ciclo normal. Os híbridos analisados possuíam endosperma semi-dentado e amarelo.

Os híbridos foram cultivados em 4 locais diferentes (Figura 12), representando as principais regiões produtoras de milho do Estado de São Paulo. Em cada região os híbridos foram plantados em períodos diferentes conforme a Tabela 11, representando um cultivo em cada estação. A adubação de plantio e de cobertura foi feita em função da análise química do solo e a irrigação foi apenas suplementar.

Delineamento experimental

O delineamento utilizado em cada época de plantio foi o de blocos casualizados com quatro repetições, ou seja, no período da colheita, 4 parcelas de cada híbrido foram sorteadas e todo milho em cada parcela foi colhido e reunido. O tamanho da parcela foi de 4 linhas de 5

metros espaçadas de 0,9 metro entrelinhas por 0,2 metro entreplantas. O milho obtido foi seco, debulhado e homogeneizado para retirada de uma amostra de 500 g. As amostras foram analisadas quanto à microbiota fúngica no Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ALMEIDA, 1996) e acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em temperatura de -10°C até o momento da determinação química para fumonisinas no Laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).



Figura 12 - Os locais onde foram coletadas as amostras de grãos de milho no Estado de São Paulo.

Tabela 11 - Épocas de plantio e colheita, ano agrícola 1994/95, dos híbridos de milho (BR 201, Cargill 901 e Contimax 322) em 4 regiões paulistas.

Região	Latitude (°)	Longitude (°)	Altura (m)	Épocas	Plantio	Colheita
Assis	22 40'	50 28'	583	1	27/09/94	16/02/95
				2	18/10/94	17/02/95
Capão Bonito	24 02'	48 22'	700	1	28/09/94	05/03/95
				2	07/11/94	17/04/95
				3	20/12/94	05/06/95
				4	16/02/95	17/08/95
				5	29/03/95	24/10/95
Ribeirão Preto	22 11'	47 48'	621	1	30/09/94	01/03/95
				2	03/11/94	27/04/95
				3	09/12/94	16/05/95
				4	07/03/95	08/08/95
				5	19/04/95	10/10/95
Votuporanga	20 25'	49 59'	505	6	23/01/95	28/06/95
				1	04/11/94	23/03/95
				2	09/12/94	18/05/95
				3	20/01/95	01/06/95

Dados climatológicos

Os dados climatológicos foram fornecidos pelo Centro de Climatologia do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Os seguintes parâmetros foram analisados: índice pluviométrico diário, temperatura mínima e temperatura máxima diários.

Determinação de Fumonisin B₁ e B₂

Padrões analíticos

O padrão de FB₁ foi obtido de CSIR Food Science and Technology (Pretoria-África do Sul) e de FB₂ da Sigma Chemical Co. (EUA). As soluções estoque individuais de FB₁ e FB₂ foram preparadas pesando-se 0,001g do padrão e dissolvendo-se em 10 mL de acetonitrila-água (1:1-v/v), respectivamente, obtendo-se uma concentração de 100 µg/mL. A solução de trabalho foi preparada a partir das soluções estoque, misturando-se 200 µL de cada solução estoque, obtendo-se uma solução de 50 µg/mL de FB₁ + FB₂. Todas as soluções de padrões foram armazenadas em frascos âmbar vedados, sob temperatura de -18°C (VISCONTI et alii, 1994).

Preparo das amostras

As amostras de milho foram trituradas em moinho até atingirem uma granulometria entre 250-500 mesh.

Extração, limpeza e determinação das fumonisinas B₁ e B₂

A determinação de FB₁ e FB₂ foi realizada segundo o método de SHEPHARD et alii (1990) com algumas modificações. Cinquenta gramas da amostra foram homogeneizadas em

liquidificador com 100 mL de metanol-água (3:1-v/v) durante 5 minutos. A mistura foi centrifugada durante 10 minutos a 2500 rpm e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro. O filtrado teve o pH corrigido, quando necessário, para um pH entre 5,8-6,5 com hidróxido de sódio 1 N. A limpeza foi realizada por extração em fase sólida com coluna de troca aniônica forte (SAX - Varian®). O condicionamento da coluna foi feito através de lavagens sucessivas com 10 mL de metanol seguidos por 10 mL de metanol-água (3:1-v/v). Foram aplicados 10 mL do extrato filtrado na coluna e, lavados com 10 mL de metanol-água (3:1-v/v) seguidos por 6 mL de metanol. As fumonisinas B₁ e B₂ foram eluídas com 20 mL de metanol-ácido acético glacial (95:5-v/v). O eluato foi evaporado sob fluxo de nitrogênio em banho de água a 60°C.

A determinação de fumonisinas foi realizada após uma derivação com o-ftaldialdeído (OPA), onde os extratos das amostras de milho foram redissolvidos em 500 µL de acetonitrila-água (1:1-v/v). Foram transferidos 100 µL deste extrato para um frasco e adicionados 200 µL do reagente OPA (dissolver 40 mg de OPA em 1 mL de metanol, diluir com 5 mL de tampão tetraborato de sódio 0,1 M pH 10,4 e adicionar 50µL de 2-mercaptoetanol). Foi agitado em ultra-som a 5-15°C durante 30 segundos, e injetados após 60 segundos de reação no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE), consistindo de uma bomba M-510 (Waters Associates, Millford, MA) com alça de injeção de 20 µL e um injetor tipo Rheodyne Inc. M-7125 (Cotati, CA) conectado a um detector de fluorescência HP 1046A com comprimento de onda de excitação de 335 nm e de emissão de 440 nm, e um integrador HP 3393A (Hewlett Packard, Avondale, PA). As separações foram feitas em coluna (250 mm x 4,6 mm) Varian^c (Walnut Creek, CA) empacotada com Microsorb-MV 5 µm ODS de fase reversa, usando uma fase móvel composta por acetonitrila-água-ácido acético glacial (50:50:0,5-v/v/v) até 15 minutos, seguida por acetonitrila pura até o final da corrida (30 minutos). A quantificação foi feita comparando-se as áreas dos picos com as áreas obtidas com a solução de trabalho (50µg/mL). Os limites de detecção para FB₁ e FB₂ foram 0,020 e 0,040 µg/g, respectivamente.

Controle de qualidade analítica

Todas as amostras foram analisadas em duplicata. As duplicatas foram analisadas em dias diferentes. Cada conjunto de amostras analisado foi acompanhado com uma amostra enriquecida artificialmente, isto é, para as amostras extraídas no mesmo dia uma quantidade de toxina (2 µg/g de FB₁ e FB₂) foi adicionada em uma amostra conhecida no dia anterior a extração. Estas amostras foram usadas para avaliar a recuperação e para a quantificação, assim todos os resultados foram corrigidos pela recuperação encontrada. Os seguintes critérios de qualidade analítica foram definidos: a recuperação deveria estar entre 58-110% e o coeficiente de variação entre as duplicatas inferior a 30%.

Análise estatística

Um delineamento “split-plot” em blocos totalmente casualizados (com graus de liberdade em parênteses) foi usado em cada cultivo com duas replicatas (blocos (1)). Os diferentes cultivos em ambientes diversos (15) foram os tratamentos principais e os subtratamentos foram as quatro regiões do Estado de São Paulo (Assis (1), Capão Bonito (4), Ribeirão Preto (5) e Votuporanga (2)) e os híbridos (2).

Um segundo delineamento “split-plot” em blocos totalmente casualizados foi utilizado para avaliar épocas de cultivo (4) entre as regiões de Capão Bonito e Ribeirão Preto (1) e o comportamento dos híbridos (2).

Os efeitos significativos principais e as interações em “split-plot” foram avaliados utilizando o teste de Duncan com 5 e 1 % do nível de probabilidade. A análise de variância (ANOVA) e o teste de Duncan foram realizados através do programa “Sistema de Análise Estatística” (SANEST) desenvolvido por Elio Prado Zonta e Amauri Almeida Machado, Escola Superior de Agronomia Luís de Queiroz, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo.

A análise de regressão linear foi realizada para correlação entre a ocorrência de fumonisinas e a presença de *Fusarium* spp. nas amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Controle de qualidade analítica

O controle de qualidade analítica realizado está apresentado na Tabela 12, e o cromatograma do extrato de milho naturalmente contaminado está sendo mostrado na figura 13.

Tabela 12 - Controle de qualidade do método de análise usado para a determinação de fumonisinas B₁ e B₂.

Características	Método	Resultado
Recuperação	Média de 12 dias. Brancos adicionados de 2 µg/g de FB ₁ e FB ₂	FB ₁ = 89,8 ± 15% FB ₂ = 79,7 ± 18%
Limite de detecção	corrigido pela recuperação	FB ₁ = 0,022 µg/g FB ₂ = 0,050 µg/g

Ocorrência de fumonisinas B₁ e B₂ em 3 híbridos de milho cultivados em 4 regiões do Estado de São Paulo, Brasil

Todos os cultivos de milho analisados continham FB₁ e FB₂ em níveis que variaram de 0,23 a 15,96 µg/g para FB₁ (concentração média de 4,46 ± 3,65 e mediana de 3,87 µg/g) e de 0,13 a 7,01 µg/g para FB₂ (1,39 ± 1,36 e 1,06 µg/g) (Tabela 13). O valor da mediana, segundo MURPHY et alii (1993), é mais representativo que a média para a distribuição de fumonisinas em milho.

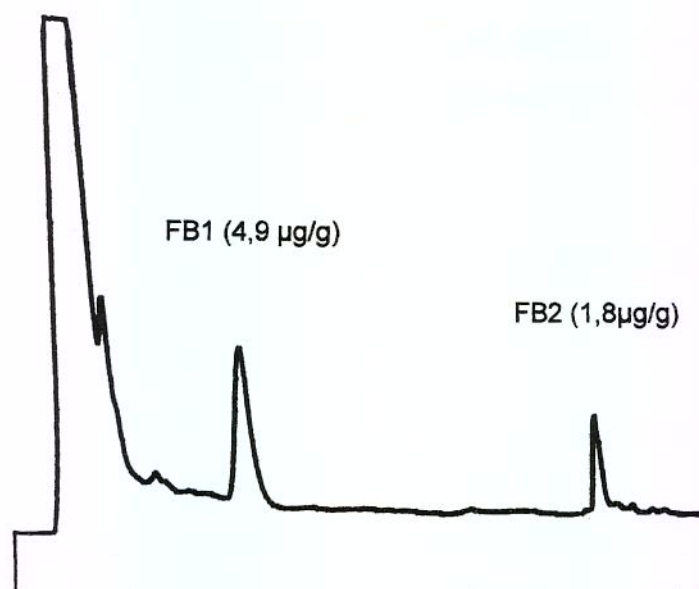


Figura 13 - Cromatograma de uma amostra de milho naturalmente contaminada com 4,9 e 1,8 µg/g de fumonisina B₁ e B₂, respectivamente. Condições cromatográficas: coluna (250 mm x 4,6 mm) Varian (Walnut Creek, CA) empacotada com Microsorb-MV 5 µm ODS de fase reversa; fase móvel composta por acetonitrila-água-ácido acético glacial (50:50:0,5-v/v/v) até 15 minutos, seguida por acetonitrila pura; comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 nm e 440 nm; fluxo de 1,0 mL/min.

Desde o primeiro relato da ocorrência natural de FB₁ em milho (SYDENHAM et alii, 1990a) vários trabalhos sobre a ocorrência de fumonisinas em milho têm sido publicados conforme a revisão bibliográfica de SHEPHARD et alii (1996). Os níveis médios de FB₁ e FB₂ nos milhos analisados foram superiores aos níveis encontrados na África do Sul (RHEEDER et alii, 1995), Argentina (SYDENHAM et alii, 1993; RAMIREZ et alii, 1996), Benin (DOKO et alii, 1995), Canadá (STACK & EPPLEY, 1992), China (YOSHIZAWA et alii, 1994; CHU & LI, 1994), Coreia do Sul (CHUNG & KIM, 1995), Costa Rica (VIQUEZ et alii, 1996; DANIELSEN & JENSEN, 1998), Croácia (DOKO et alii, 1995), Estados Unidos (MURPHY et alii, 1993; CHAMBERLAIN et alii, 1993; RICE & ROSS, 1994; SHELBY et alii, 1994), Filipinas (YAMASHITA et alii, 1995), Holanda (NIJS et alii, 1998), Índia (SHETTY & BHAT, 1997), Indonésia (YAMASHITA et alii, 1995), Itália (BOTTALICO et alii, 1995; DOKO & VISCONTI, 1994; DOKO et alii, 1995), Malawii, Moçambique (DOKO et alii, 1996), Nepal (UENO et alii, 1993), Polônia (DOKO et alii, 1995; PASCALE et alii, 1997), Portugal (DOKO et alii, 1995), Quênia (DOKO et alii, 1996), Romênia (DOKO et alii, 1995), Tailândia

(YOSHIZAWA et alii, 1996), Tanzânia, Uganda (DOKO et alii, 1996), Uruguai (PIÑERO et alii, 1997), Zâmbia (DOKO et alii, 1995) e Zimbábue (DOKO et alii, 1996), cujos níveis médios variaram de 0,01 a 3,15 $\mu\text{g/g}$ para FB_1 e de 0,004 a 1,6 $\mu\text{g/g}$ para FB_2 . Os valores médios foram semelhantes aos relatados no Brasil (Estados de Goiás, Mato Grosso do Sul e Paraná) (HIROOKA et alii, 1996) e na China (UENO et alii, 1993), cujos níveis médios variaram de 2,72 a 10,59 $\mu\text{g/g}$ para FB_1 e 2,34 a 10,31 $\mu\text{g/g}$ para FB_2 . Mas, os valores por nós encontrados foram inferiores aos relatados nos Estados Unidos por SHELBY et alii (1994) cujos níveis variaram de 5,8 a 30,5 $\mu\text{g/g}$.

Os níveis de FB_1 e FB_2 (média $\pm$ desvio padrão e mediana entre parênteses) variaram de 0,23 a 15,96 (4,59 $\pm$ 4,31 e 3,48) e de 0,13 a 5,87 (1,47 $\pm$ 1,49 e 1,06) $\mu\text{g/g}$ no híbrido BR 201, de 0,26 a 11,03 (4,88 $\pm$ 2,74 e 4,70) e de 0,21 a 3,13 (1,40 $\pm$ 0,89 e 1,25) $\mu\text{g/g}$ no híbrido Cargill 901 e de 0,30 a 13,58 (3,92 $\pm$ 3,88 e 2,64) e de 0,16 a 7,01 (1,29 $\pm$ 1,65 e 0,76) $\mu\text{g/g}$ no híbrido Contimax 322, respectivamente. Os níveis médios de fumonisinas encontrados foram maiores do que aqueles detectados em genótipos da Argentina (RAMIREZ et alii, 1996), Benin, Croácia, Itália, Portugal, Romênia, Zâmbia (DOKO et alii, 1995) e Polônia (DOKO et alii, 1995; PASCALE et alii, 1997) (Figura 14).

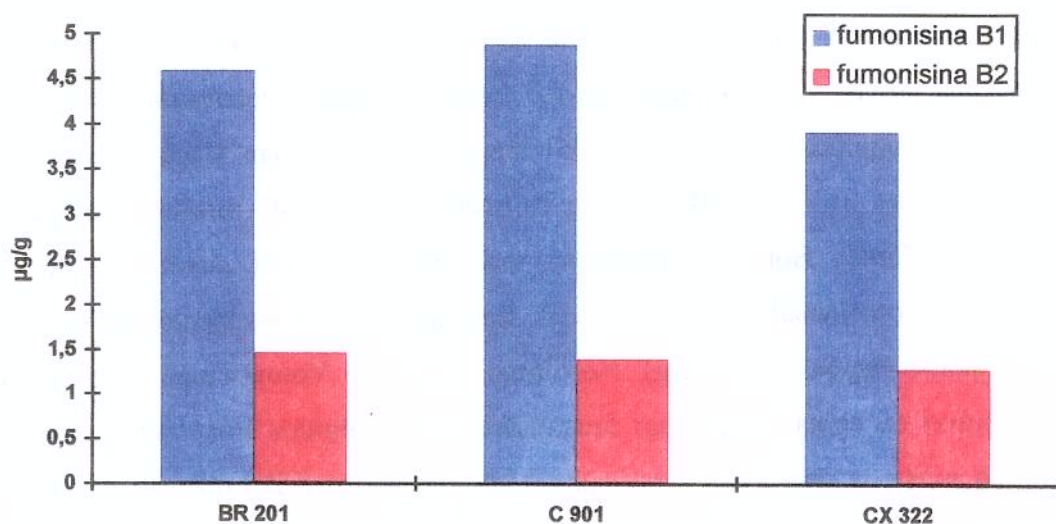


Figura 14 - Níveis médios de FB_1 e FB_2 em 3 híbridos (BR 201, C 901 e CX 322) de milho provenientes do Estado de São Paulo, safra 1994/1995.

Nenhuma correlação foi observada entre os níveis de fumonisinas encontrados e o fator de precocidade do híbrido em cada região. Comportamento semelhante foi observado por DOKO et alii (1995). Entretanto, os autores sugerem que há uma correlação positiva entre a contaminação por fumonisinas e o tempo de exposição das sementes de milho a infecção fúngica. Em nosso experimento, o híbrido Contimax 322 com ciclo vegetativo maior que os demais híbridos, apresentou uma contaminação média inferior aos híbridos de ciclo precoce e super-precoce. Uma vez que a colheita foi realizada na mesma época para todos os híbridos (Tabela 11), o tempo de permanência da espiga no campo do híbrido CX 322 após o período de maturação foi menor que os híbridos de ciclo precoce e super-precoce, por ter ciclo vegetativo maior. Este fato pode contribuir para que este híbrido apresente uma contaminação média de fumonisinas inferior aos demais híbridos. Para verificar o efeito de tempo de permanência da espiga no campo após a maturação foi realizado um teste de correlação com a quantidade de FB₁ e FB₂ encontrada. A correlação foi negativa tanto para FB₁ ($r=-0,40$) como para FB₂ ($r=-0,36$).

Os níveis de FB₁ e FB₂ (média±desvio padrão e mediana entre parênteses) variaram de 3,15 a 11,10 (6,57±3,03 e 5,52) e de 0,57 a 3,26 (1,94±0,97 e 1,73) µg/g em Assis, de 0,23 a 11,03 (3,08±3,12 e 2,01) e de 0,14 a 3,13 (1,09±0,93 e 0,83) µg/g em Capão Bonito, de 1,65 a 11,68 (4,48±2,47 e 4,02) e de 0,50 a 2,22 (1,14±0,57 e 1,06) µg/g em Ribeirão Preto e de 0,30 a 15,96 (5,33±5,90 e 4,02) e de 0,13 a 7,01 (1,99±2,66 e 0,54) µg/g em Votuporanga, respectivamente (Figura 15). As figuras 16, 17 e 18 mostram a temperatura mínima mensal, a temperatura máxima mensal e o total pluviométrico mensal nas quatro localidades estudadas. Os níveis de FB₁ foram significativamente ($P<0,05$) menores somente em Capão Bonito, e não houve diferença entre as regiões estudadas para os níveis de FB₂. Este resultado sugere que o milho da região de Capão Bonito, temperatura mais baixa e menor quantidade de chuva, apresentou-se menos contaminado por fumonisinas. Entretanto, os níveis médios de fumonisinas foram altos nas quatro regiões (> 1 µg/g). No último cultivo de Votuporanga observou-se um aumento considerável da contaminação por fumonisinas nos 3 híbridos amostrados, coincidindo com o ataque de pássaros (maritacas e periquitos) comum nesta região que, ao danificarem a espiga favorecem a entrada de fungos produtores de fumonisinas.

Tabela 13 -Ocorrência natural de fumonisinas B₁ e B₂ em 3 híbridos de milho provenientes de 4 estações experimentais do Estado de São Paulo, Brasil.

Épocas ^{aa}	Híbridos de milho	concentração de fumonisina (µg/g) ^{***}			
		FB ₁	FB ₂	FB ₁ + FB ₂	FB ₂ /FB ₁
<i>Assis</i>	BR 201	5,99	1,79	7,78	0,30
		11,10	3,26	14,36	0,29
	C 901	4,76	1,51	6,27	0,32
		9,35	2,86	12,21	0,31
	Cx 322	5,05	1,66	6,71	0,33
		3,15	0,57	3,72	0,18
<i>Capão Bonito</i>	BR 201	2,67	0,96	3,63	0,36
		7,36	2,63	9,99	0,36
		1,97	0,83	2,80	0,42
		0,23	0,16	0,39	0,70
		0,37	0,14	0,51	0,38
	C 901	11,03	3,13	14,16	0,28
		5,07	1,52	6,59	0,30
		4,81	1,70	6,51	0,35
		0,26	0,21	0,47	0,81
		2,01	0,75	2,76	0,37
	Cx 322	2,54	1,29	3,83	0,51
		5,37	1,84	7,21	0,34
		0,39	0,22	0,61	0,56
		0,33	0,19	0,52	0,58
		1,81	0,80	2,61	0,44
	BR 201	3,71	1,30	5,01	0,35
		1,66	0,54	2,20	0,33
		6,38	2,14	8,52	0,34
		6,56	1,50	8,06	0,23
		5,01	1,07	6,08	0,21
		3,24	1,04	4,28	0,32
	C 901	4,33	1,25	5,58	0,29
		6,95	2,22	9,17	0,32
		2,23	0,54	2,77	0,24
		3,38	0,80	4,18	0,24
		2,97	0,63	3,60	0,21
		4,84	0,92	5,76	0,19
	Cx 322	4,56	1,23	5,79	0,27
		1,65	0,59	2,24	0,36
		11,68	2,19	13,87	0,19
		6,35	1,33	7,68	0,21
		2,45	0,50	2,95	0,20
		2,74	0,72	0,72	0,26
<i>Votuporanga</i>	BR 201	0,79	0,13	0,92	0,16
		0,39	0,15	0,54	0,38
		15,96	5,87	21,83	0,37
	C 901	4,02	0,54	4,56	0,13
		4,63	1,24	5,87	0,27
		7,45	2,58	10,03	0,35
	Cx 322	0,30	0,16	0,46	0,53
		0,83	0,27	1,10	0,33
		13,58	7,01	20,59	0,52

* limite de detecção - FB₁ = 0,020 µg/g FB₂ = 0,040 µg/g ** épocas - mês de plantio (ver Tabela 11)

*** concentração média das duplicatas corrigidas pelo valor das recuperações obtidas na data da análise.

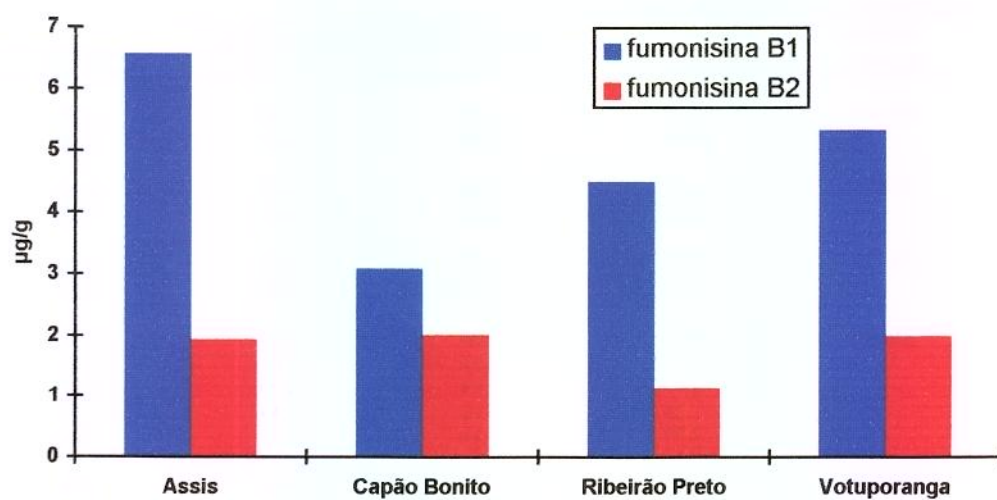


Figura 15 - Níveis médios de FB₁ e FB₂ provenientes das regiões de Assis, Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, safra 1994/1995.

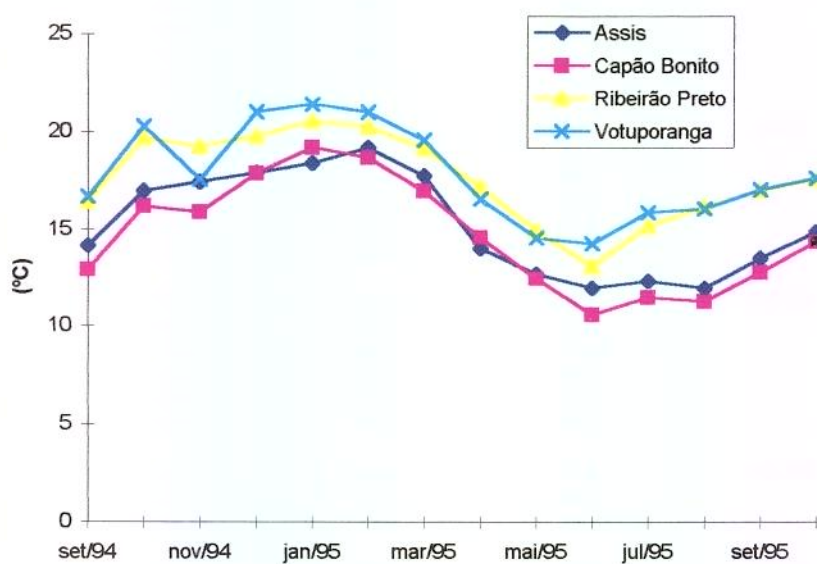


Figura 16 - Temperatura mínima mensal para quatro localidades paulistas.

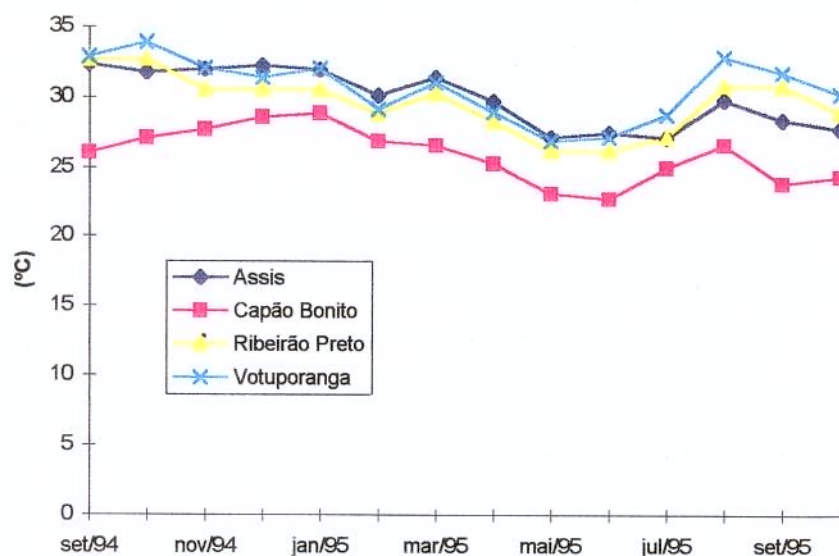


Figura 17 - Temperatura máxima mensal para quatro localidades paulistas.

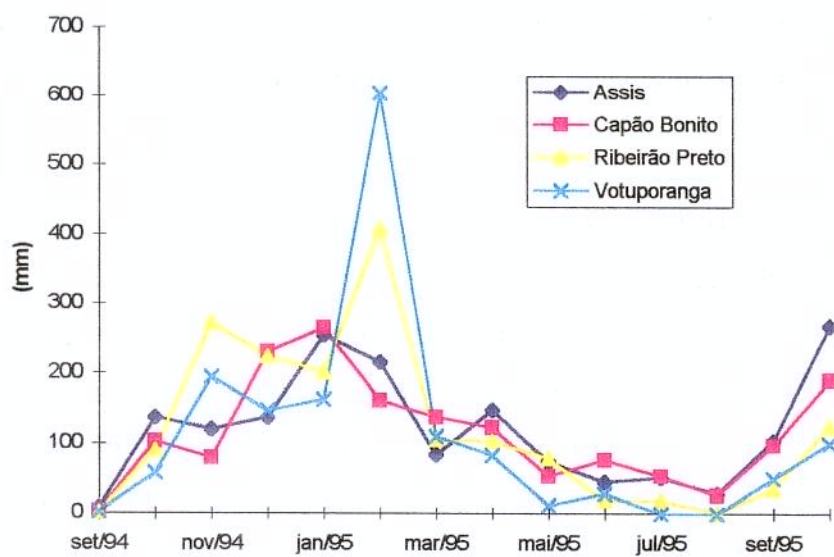


Figura 18 - Total pluviométrico mensal para quatro localidades paulistas.

A concentração total de FB₁ e FB₂ variou de 0,39 a 21,83 µg/g com um valor médio de 5,79±4,97 e mediana de 4,79 µg/g. A figura 19 mostra que a variação prevalente de FB₁ + FB₂ nos milhos analisados foi de 2,51 a 7,50 µg/g, com uma frequência de 50%. Acima de 80% das amostras continham níveis superiores a 1 µg/g, limite proposto pela Suíça como limite temporário para milho e produtos derivados do milho destinados a população humana (ZOLLER et alii, 1994). Foi observado que esta frequência (83,33%) foi bem superior ao verificado em outros países, como: 5,5% na Coreia do Sul (CHUNG & KIM, 1995), 22,9% na Índia (SHETTY & BHAT, 1997), 30% na Itália (DOKO & VISCONTI, 1994), 5,4% em países do Leste e do Sul da África (DOKO et alii, 1996), 5,6% em países do Sudeste da Ásia (YAMASHITA et alii, 1995) e 14% no Uruguai (PIÑERO et alii, 1997); mas próximo ao 60% relatados na Argentina (RAMIREZ et alii, 1996). Vinte e quatro amostras (50%) estavam contaminadas com níveis de FB₁ e FB₂ acima de 5 µg/g, níveis de contaminação consideradas importantes segundo as recomendações da Comissão de Micotoxinas da “American Association of Veterinary Diagnosticians” (RILEY et alii, 1993). Um total de 5 amostras (10,42%) apresentaram níveis de FB₁ acima de 10 µg/g, ou seja, quantidade suficiente para causar a leucoencefalomalácia em eqüinos segundo ROSS et alii (1992). Estes dados, como os demonstrados por HIROOKA et alii (1996), são importantes por apresentar risco potencial a saúde humana e animal.

A razão FB₂/FB₁ variou de 0,13 a 0,81 (média±desvio padrão = 0,34±0,14, mediana = 0,33). Estes dados mais uma vez confirmam que a FB₁ é a que normalmente predomina dentre as fumonisinas produzidas sob condições naturais (THIEL et alii, 1992). A relação média FB₂/FB₁ em amostras provenientes da Argentina foi de 0,30 (RAMIREZ et alii, 1996), 0,29 em amostras de Benin, Croácia, Itália, Polônia, Portugal, Romênia e Zâmbia (DOKO et alii, 1995) e 0,33 em amostras dos Estados Unidos (STACK & EPPLEY, 1992), semelhantes a relação média obtida no presente trabalho (0,34).

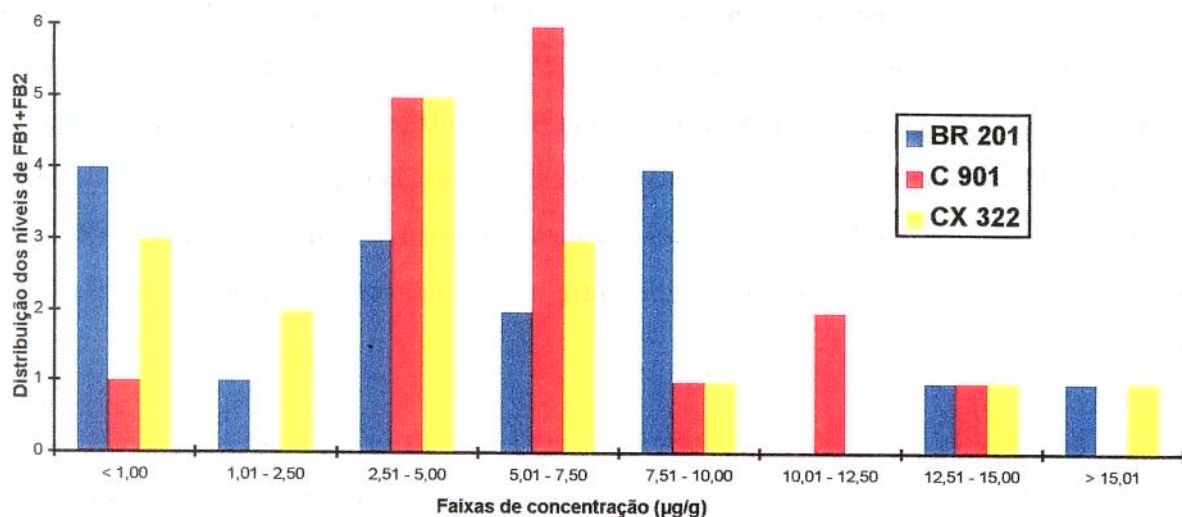


Figura 19 - Distribuição em níveis das fumonisinas B₁+B₂ em 3 híbridos de milho plantado em 4 estações experimentais de São Paulo, na safra 1994/1995.

Avaliação da influência das variáveis climáticas e micoflora na produção de fumonisinas nos híbridos analisados

A análise estatística dos dados totais mostra que há diferenças significativas entre as épocas ($P < 0,001$). Através do desdobramento estatístico entre os híbridos e as regiões de plantio foi comprovado que a distribuição dos níveis de fumonisinas em cada época é de forma aleatória dentro de cada local e cultivar. Estes resultados sugerem uma relação com as condições ambientais. Para verificar o efeito ambiente foi realizado uma segunda análise no delineamento de blocos casualizados ao acaso com parcela subdividida com as épocas 1 a 5 de Capão Bonito e Ribeirão Preto, pois apresentavam épocas de plantio semelhantes.

A análise de variância e o teste de Duncan demonstraram que há diferenças significativas ($P < 0,001$) nos níveis de FB₁ e FB₂ em função da época de plantio (Tabela 13). Os cultivos 4 e 5 foram da safra cultivada extemporaneamente (“safrinha”), considerados mais susceptíveis a infecções e maiores danos nas sementes (HIROOKA et alii, 1996). Entretanto, os

resultados demonstraram que neste período os níveis de contaminação por fumonisinas foram menores, quando correlacionados com as condições climáticas do Estado de São Paulo. Os meses de verão são marcados por altas temperaturas e alta pluviosidade, contrastando com os meses de inverno que são caracterizados pela diminuição acentuada do índice pluviométrico (BRUNINI, 1997) (Figuras 16, 17 e 18). Entretanto, estes resultados diferem dos encontrados por HIROOKA et alii (1996) que não encontraram diferenças entre a safra normal e a “safrinha” no Estado do Paraná.

Os principais fatores que têm sido apontados como possíveis responsáveis por altas contaminações em milho por fumonisinas são: temperaturas elevadas, umidade baixa e tempo seco (SHELBY et alii, 1994), chuvas durante a maturação da espiga ou época da colheita (BACON & NELSON, 1994, VIQUEZ et alii, 1996 e SHETTY & BHAT, 1997) e o dano causado por insetos (SHEPHARD et alii, 1996; DANIELSEN & JENSEN, 1998).

Amostras de milho colhidas em período chuvoso associado a temperaturas baixas ($<20^{\circ}\text{C}$), não apresentaram altos níveis de fumonisinas (dados observados em Capão Bonito). Entretanto, estudos de laboratório têm estabelecido que a temperatura ótima de produção de fumonisinas encontra-se entre 15 a 20 $^{\circ}\text{C}$. Le BARS et alii (1994) verificaram que temperaturas entre 19 a 28 $^{\circ}\text{C}$ ocorre uma grande produção de FB_1 pelo *F. moniliforme*, com um máximo a 20 $^{\circ}\text{C}$. MELCION et alii (1998) demonstraram que a melhor temperatura de produção de FB_1 pelo *F. proliferatum* é de 15 $^{\circ}\text{C}$.

A umidade necessária para haver produção de FB_1 em grãos de milho é de 22 a 50%, com uma produção máxima a 32% (Le BARS et alii, 1994). A atividade de água (Aa) de 0,925 produz pequena quantidade de FB_1 e FB_2 , sendo que 0,956 de Aa para o *F. moniliforme* e 0,968 para o *F. proliferatum* são as condições ideais para a produção destas micotoxinas (MARIN et alii, 1995). Portanto, os dados da Tabela 14 sugerem que a produção de fumonisinas ocorreu antes da secagem das amostras, ou seja, na pré-colheita ou durante a colheita, pois

segundo CHULZE et alii (1996), na Argentina, onde o ciclo completo de desenvolvimento do milho é mais longo que no Brasil, a produção de fumonisinas ocorre após 75 dias do florescimento, na última etapa de maturação dos grãos onde há prevalência do *F. proliferatum* e *F. moniliforme*.

A correlação entre o nível de contaminação com *Fusarium* e a concentração de fumonisinas detectadas nas mesmas amostras foi nula ($r(FB_1) = 0,048$ e $FB_2 = -0,088$). Semelhante ao resultado obtido na Argentina por RAMIREZ et alii (1996) e na Costa Rica por DANIELSEN & JENSEN (1998). Mas diferindo dos resultados obtidos na África do Sul por RHEEDER et alii (1992), cuja correlação foi pobre em amostras visualmente fungadas e SYDENHAM et alii (1993) que foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

As análises microbiológicas realizadas por ALMEIDA et alii (1996) demonstraram uma população fúngica constituída predominantemente por *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. e *Penicilium* spp. (Tabela 14), fungos importantes do ponto de vista toxigênico (LILLEHOJ & ZUBER, 1988). Os demais fungos encontrados (*Geotrichum* spp., *Cladosporium* spp., *Trichoderma* spp. e Fungos Não Esporulados), normalmente aparecem colonizando a planta em crescimento no campo. Entretanto, tais microrganismos não são importantes quanto a produção de micotoxinas. Do total de amostras, a espécie predominante foi o *F. moniliforme* (53,8%) seguido pelo *A. flavus* (17,9%) e *F. subglutinans* (7,7%). Ao considerar o número de unidade formadoras de colônias (UFC/grama) (Tabela 14), os valores obtidos encontram-se acima dos normais, recomendados pela "International Commission on Microbiological Specifications for Foods" (1980), na ordem de 10^2 - 10^4 . No Brasil, outros autores também referem à alta frequência de *F. moniliforme* (MEIRELLES et alii, 1994; POZZI et alii, 1995 e HIROOKA et alii, 1996), quanto ao *F. subglutinans*, os resultados são discordantes de POZZI et alii (1995) que verificaram a incidência nula deste fungo, porém apontam o *F. proliferatum* como a segunda espécie mais comum em milho. CHULZE et alii (1996) mostrou que o *F. subglutinans* foi a espécie predominante no período de 60 dias após o florescimento e não durante a colheita, cuja prevalência é do *F. moniliforme* e *F. proliferatum*.

Tabela 14 - Umidade, atividade de água e unidade formadoras de colônias de fungos do gênero *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e outros de 48 amostras de híbridos de milho coletados em 4 estações experimentais agrícolas do Estado de São Paulo, safra 1994/1995 (ALMEIDA, 1996).

de São Paulo, safra 1994/1995 (ALMEIDA, 1996).								
Épocas *	Híbridos de milho	Teor de umidade (%)	Atividade de água (Aa)	Contagem de fungos (UFC/g x 10 ⁴)				Total
				<i>Fusarium</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	Outros **	
<i>Assis</i>								
1	BR 201	10,6	0,63	4	20	41	0	65
2		11,4	0,63	0	66	0	0	66
1	C 901	12,1	0,63	0	108	6	0	114
2		11,8	0,63	0	79	3	0	82
1	Cx 322	10,5	0,63	0	11	5	0	16
2		11,1	0,62	43	8	0	0	51
<i>Capão Bonito</i>								
1	BR 201	11,0	0,68	0	0	6	0	6
2		10,5	0,61	48	0	3	0	51
3		11,3	0,74	14	0	0	0	14
4		5,0	0,60	0	0	0	34	34
5		8,6	0,57	0	0	0	1	1
1	C 901	13,5	0,69	0	0	20	0	20
2		11,6	0,62	43	0	25	0	68
3		11,8	0,73	2	1	0	0	3
4		16,8	0,54	4	0	0	28	32
5		8,9	0,54	0	0	0	4	4
1	Cx 322	14,0	0,70	0	0	4	0	4
2		10,8	0,30	7	0	23	0	30
3		10,6	0,99	0	4	0	0	4
4		16,2	0,53	17	0	0	0	17
5		9,3	0,56	5	0	0	2	7
<i>Ribeirão Preto</i>								
1	BR 201	11,5	0,69	0	0	7	0	7
2		10,6	0,65	100	0	0	0	100
3		9,6	0,65	141	0	0	0	141
4		9,0	0,56	53	0	0	0	53
5		9,1	0,59	0	0	7	0	7
6		10,6	0,61	18	0	0	0	18
1	C 901	12,0	0,73	0	0	6	0	6
2		9,6	0,65	8	0	1	1	10
3		11,4	0,65	127	0	2	0	129
4		8,6	0,52	107	0	4	0	111
5		12,2	0,58	31	0	2	0	33
6		11,0	0,61	169	0	0	0	169
1	Cx 322	12,5	0,74	0	0	12	0	12
2		10,8	0,65	6	0	1	0	7
3		9,4	0,66	153	0	0	0	153
4		9,0	0,53	33	0	0	0	33
5		9,4	0,58	137	0	0	0	137
6		10,3	0,62	119	0	0	0	119
<i>Votuporanga</i>								
1	BR 201	9,1	0,57	0	1	0	3	4
2		8,4	0,65	0	0	4	0	4
3		9,3	0,66	0	0	0	1	1
1	C 901	10,3	0,57	4	2	1	0	7
2		8,6	0,64	0	1	0	0	1
3		9,3	0,66	0	0	1	0	1
1	Cx 322	9,4	0,58	0	1	0	0	1
2		9,0	0,66	0	2	0	0	2
3		9,3	0,66	4	5	0	0	9

* - Épocas - mês de plantio (ver Tabela 11)

** - Outros: *Geotrichum* spp., *Trichoderma* spp., *Cladosporium* spp. e Fungos Não Esporulados.

CONCLUSÕES

Os dados colhidos no presente trabalho mostram teores de fumonisinas no milho do Estado de São Paulo dentre os mais elevados do mundo e indicam a necessidade tanto de fiscalização como de estudos que indiquem meios de evitar a produção da toxina ou ainda que viabilizem a sua eliminação.

A avaliação dos fatores climáticos e agronômicos com relação a produção de fumonisinas nos cultivares de milho estudados demonstraram que condições ambientais tais como índice pluviométrico elevado, temperatura elevada (Setembro a Março) e a época de plantio (safra normal) favoreceram a produção de altos níveis de fumonisinas. Pesquisas futuras são necessárias para determinar a relação entre contaminação por fumonisinas e a resistência de híbridos em cada região de plantio durante as safras agrícolas anuais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ALMEIDA, A.P. **Microbiota fúngica e produção de aflatoxinas e fumonisinas, por cepas de *Aspergillus flavus* Link e *Fusarium moniliforme* Sheldon, de três híbridos de grãos de milho recém-colhido.** São Paulo, 1996. 120 ps. (Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
02. BACON, C.W., NELSON, P.E. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 57, n. 6, p. 514-521, June 1994.
03. BEZUIDENHOUT, S.C., GELDERBLOM, W.C.A., GORST-ALLMAN, C.P., HORAK, R.M., MARASAS, W.F.O., SPITELLER, G., VLEGGAAR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society Chemical Communications**, Cambridge, v. 11, p. 743-745, 1988.
04. BOTTALICO, A., LOGRIECOS, A., RITIENI, A., MORETTI, A., RANDAZZO, G., CORDA, P. Beauvericin and fumonisin B₁ in preharvest *Fusarium moniliforme* maize ear

rot in Sardinia. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 12, n. 4, p. 599-607, 1995.

05. BRUNINI, O. Probabilidade de cultivo do milho "safrinha" no Estado de São Paulo. **Anais do IV Seminário sobre a cultura do milho "safrinha"**. Assis, p. 37-55, 1997.
06. BUCCI, T.J., HANSEN, D.K., LaBORDE, J.B. Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin Fumonisin B₁. **Natural Toxins**, New York, v. 4, n. 1; p. 51-52, 1996.
07. BULLERMAN, L.B., TSAI, W.J. Incidence and levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn and corn-based foods and feeds. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 57, n. 6, p. 541-546, 1994.
08. CASTEGNARO, M., WILD, C. IARC activities in mycotoxin research. **Natural Toxins**, New York, v. 3, p. 327-331, 1995.
09. CHAMBERLAIN, W.J., BACON, C.W., NORRED, W.P., VOSS, K.A. Levels of fumonisin B₁ in corn naturally contaminated with aflatoxins. **Food Chemical Toxicology**, London, v. 31, n. 12, p. 995-998, 1993.
10. CHEN, J., MIROCHA, C.J., XIE, W., HOGGLE, L., OLSON, D. Production of the mycotoxin fumonisin B₁ by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 12, p. 3928-3931, 1992.
11. CHU, F.S., LI, G.Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the people's republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 3, p. 847-852, Mar. 1994.
12. CHULZE, S.N., RAMIREZ, M.L., FARNOCHI, M.C., PASCALE, M., VISCONTI, A., MARCH, G. *Fusarium* and fumonisin occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 9, p. 2797-2801, 1996.
13. CHUNG, S.H., KIM, Y.B. Natural occurrence of fumonisin B₁ in Korean corn and rough rice. **Food and Biotechnology**, New York, v. 4, n. 3, p. 212-216, 1995.
14. COLVIN, B.M., HARRISON, L.R. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, n. 1-2, p. 79-82, 1992.
15. DANIELSEN, S., JENSEN, D.F. Relationships between seed germination, fumonisin content, and *Fusarium verticillioides* infection in selected maize samples from different regions of Costa Rica. **Plant Pathology**, Oxford, v. 47, p. 609-614, 1998.

16. DOKO, M.B., CANET, C., BROWN, N., SYDENHAM, E.W., MPUCHANE, S., SIAME, B.A. Natural co-occurrence of fumonisins and zearalenone in cereals and cereal-based foods from Eastern and Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 10, p. 3240-3243, 1996.
17. DOKO, M.B., RAPIOR, S., VISCONTI, A., SCHJOTH, J.E. Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 2, p. 429-434, 1995.
18. DOKO, M.B., VISCONTI, A. Occurrence of fumonisin B₁ and B₂ in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 11, n. 4, p. 433-439, 1994.
19. FRANCHESCHI, S., BIDOLI, E., BARON, A.E., LA VECCHIA, C. Maize and risk of cancers of the oral cavity, pharynx, and esophagus in Northeastern Italy. **Journal of the National Cancer Institute**, Cary, v. 82, p. 1407-1411, 1990.
20. GELDERBLUM, W.C.A., JASKIEWICZ, K., MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G., HORAK, R., VLEGGAAR, R., KRIEK, N.P.J. Fumonisins: novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v. 54, n. 7, p. 1806-1811, July 1988.
21. GELDERBLUM, W.C.A., KRIEK, N.P.J., MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁, in rats. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 12, n. 7, p. 1247-1251, 1991.
22. HARRISON, L.R., COLVIN, B.M., GREENE, J.T., NEWMAN, L.E., COLE, J.R. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, atoxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Diagnostics Investigation**, Turlock, v. 2, n. 3, p. 217-222, 1990.
23. HASCHEK, W.M., MOTELIN, G., NESS, D.K., HARLIN, K.S., HALL, W.F., VESONDER, R.F., PETERSON, R.E., BEASLEY, V.R. Characterization of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, n. 1-2, p. 83-96, 1992.
24. HEADRICK, J.M., PATAKY, J.K. Maternal influence on the resistance of sweet corn lines to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, p. 268-274, 1991.
25. HIROOKA, E.Y., YAMAGUCHI, M.M., AOYAMA, S., SUGIURA, Y., UENO, Y. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 2, p. 173-183, Feb-Mar. 1996.

26. IARC. **Some naturally occurring substances: Food items and constituents. Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins.** IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 56, Lyon: IARC, 1993.
27. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Levantamento sistemático da produção agrícola, [<http://www.sidra.ibge.gov.br/cgi-bin/prtabl>], 12/07/1999.
28. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS, **Microbiological ecology of foods.** New York: Academic Press, 1980.
29. KING, S.B., SCOTT, G.E. Genotypic differences in maize to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 71, p. 1245-1247, 1981.
30. Le BARS, J., Le BARS, P., DUPUY, J., BOUDRA, H. Biotic and abiotic factors in fumonisin B₁ production and stability. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 77, n. 2, p. 517-521, 1994.
31. LESLIE, J.F., PLATTNER, R.D., DESJARDINS, A.E., KLITTICH, C.J.R. Fumonisin B₁ production by strains from different mating populations of *Giberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, p. 341-345, 1992.
32. LILLEHOJ, E.B., ZUBER, M.S. Distribution of toxin-producing fungi in nature maize kernels from diverse environments. **Tropical Science**, London, v. 28, n. 1, p. 19-24, 1988.
33. MARASAS, W.F.O., KELLERMAN, T.S., GELDERBLUM, W.C.A., COTZER, J.A.W., THIEL, P.G., Van der LUGT, J.J. Leukoencephalomalacia in horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Onderstepoort, v. 55, p. 197-203, 1988.
34. MARIN, S., SANCHIS, V., VINAS, I., CANELA, R., MAGAN, N. Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B₁ and B₂ production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* on maize grain. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 298-301, 1995.
35. MEIRELLES, M.C.A., CORRÊA, B., FISCHMAN, O., GAMBALE, W., PAULA, C.R., CHACON-RECHE, N.O., POZZI, C.R. Mycoflora of the toxic feeds associated with equine leukoencephalomalacia (ELEM) outbreaks in Brazil. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 127, p. 183-188, 1994.
36. MELCION, D., CAHAGNIER, B., BAKAN, B., RICHARD-MOLARD, D. Influence of temperature on fumonisin B₁ production on maize grain by *Fusarium proliferatum*. **Sciences des Aliments**, Cachan, v. 18, n. 3, p. 301-311, 1998.
37. MILLER, J.D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research**, Kidlington, v. 31, n. 1, p. 1-16, 1995.

38. MUNIMBAZI, C., BULLERMAN, L.B. Molds and mycotoxins in foods from Burundi. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 8, p. 869-875, 1996.
39. MURPHY, P.A., RICE, L.G., ROSS, P.F. Fumonisin B₁, B₂ and B₃ content of Iowa, Wisconsin, and Illinois corn and corn screenings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 41, n. 2, p. 263-266, 1993.
40. NELSON, P.E., ODVODY, G., MILLIANO, W.O., KAULA, G., MATALAOTE, B. *Fusarium* on sorghum and pearl millet grain in Botswana, Zambia and Zimbabwe. **Sorghum Newsletter**, Tucson, v. 32, p. 42, 1991.
41. NIJS, M., SIZOO, E.A., ROMBOUTS, F.M., NOTERMANS, S.H.W., Van EGMOND, H.P. Fumonisin B₁ in maize for food production imported in the Netherlands. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 15, n. 4, p. 389-392, May-June 1998.
42. NOGUEIRA Jr., S., NOGUEIRA, E.A., TSUNECHIRO, A. **Considerações sobre a agroindústria do milho**. Relatório de Pesquisa do Instituto de Economia Agrícola, 1987, 18 p.
43. PASCALE, M., VISCONTI, A., PRONCZUK, M., WISNIEWSKA, H., CHELKOWSKI, J. Accumulation of fumonisins in maize hybrids inoculated under field conditions with *Fusarium moniliforme* Sheldon. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 74, n. 1, p. 1-6, 1997.
44. PIÑERO, M.S., SILVA, G.E., SCOTT, P.M., LAWRENCE, G., STACK, M.E. Fumonisin levels in Uruguayan corn products. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 80, n. 4, p. 825-828, 1997.
45. POZZI, C.R., CORRÊA, B., GAMBALE, W., PAULA, C.R., CHACON-RECHE, N.O., MEIRELLES, C.A. Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxin occurrence. **Food Additives and Contaminants**. London, v. 12, n. 3, p. 313-319, 1995.
46. RAMIREZ, M.L., PASCALE, M., CHULZE, S., REYNOSO, M.M., MARCH, G., VISCONTI, A. Natural occurrence of fumonisins and their correlation to *Fusarium* contamination in commercial corn hybrids in Argentina. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 135, p. 29-34, 1996.
47. RHEEDER, J.P., MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G., SYDENHAM, E.W., SHEPHARD, G.S., Van SCHALKWYK, D.J. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation for human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, p. 353-357, 1992.
48. RHEEDER, J.P., MARASAS, W.F.O., Van WYK, P.S., Du TOIT, W., PRETORIUS, A.J., Van SCHALKWYK, D.J. Incidence of *Fusarium* and *Diplodia* species and other fungi in

naturally infected grain of South african maize cultivars. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 22, p. 97-102, 1990.

49. RHEEDER, J.P., SYDENHAM, W.E., MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G., SHEPHARD, G.S., SCHLECHTER, M., STOCKENSTRÖM, S., CRONJE, D.W., VILJOEN, J.H. Fungal infestation and mycotoxin contamination of South African commercial maize harvested in 1989 and 1990. **South African Journal of Science**, Pretoria, v. 91, p. 127-131, Mar. 1995.
50. RICE, L.G., ROSS, P.F. Methods for detection and quantitation of fumonisins in corn, cereal products and animal excreta. **Journal of Protection**, Des Moines, v. 57, n. 6, p. 536-540, June 1994.
51. RILEY, R.T., NORRED, W.P., BACON, C.W. Fungal toxins in foods: recent concerns. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 13, p. 167-189, 1993.
52. ROSS, P.F., NELSON, P.E., RICHARD, J.L., OSWEILLER, G.D., RICE, L.G., PLATTNER, R.D., WILSON, T.M. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leucoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 10, p. 3225-3226, 1990.
53. ROSS, P.F., RICE, L.G., OSWEILLER, G.D., NELSON, P.E., RICHARD, J.L., WILSON, T.M. A review and update of animal toxicoses associated with fumonisin-contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, n. 1-2, p. 109-114, 1992.
54. SHELBY, R.A., WHITE, D.G., BAUSKE, E.M. Differential fumonisin production in maize hybrids. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, n. 6, p. 582-584, June 1994.
55. SHEPHARD, G.S., SYDENHAM, E.W., THIEL, P.G., GELDERBLUM, W.C.A. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, New York, v. 13, n. 10, p. 2077-2087, Oct. 1990.
56. SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., STOCKENSTRÖM, S., SYDENHAM, E.W. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 79, n.3, p. 671-687, 1996.
57. SHETTY, P.H., BHAT, R.V. Natural occurrence of fumonisin B₁ and its co-occurrence with aflatoxin B₁ in Indian sorghum, maize, and poultry feeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, n. 6, p. 2170-2173, 1997.

58. STACK, M.E., EPPLEY, R.M. Liquid chromatographic determination of fumonisin B₁ and B₂ in corn and corn products. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 75, n. 5, p. 834-837, 1992.
59. SYDENHAM, E.W., GELDERBLOM, W.C.A., THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 1, p. 285-290, 1990a.
60. SYDENHAM, E.W., SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O., RHEEDER, J.P., SANHUEZA, C.E.P., GONZÁLEZ, H.H.L., RESNIK, S.L. Fumonisin in Argentinian field-trial corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 41, n. 6, p. 891-895, 1993.
61. SYDENHAM, E.W., SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O., STOCKENSTROM, S. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, n. 11, p. 2014-2016, 1991.
62. SYDENHAM, E.W., THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O., SHEPHARD, G.S., Van SCHALKWYK, D.J., KOCH, K.R. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 10, p. 1900-1903, 1990b.
63. THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O., SYDENHAM, E.W., SHEPHARD, G.S., GELDERBLOM, W.C.A. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, n. 1-2, p. 3-9, 1992.
64. UENO, Y., AOYAMA, S., SUGIURA, Y., WANG, D.S., LEE, U.S., HIROOKA, E.Y., HARA, S., KARKI, T., CHEN, G., YU, S.Z. A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. **Mycotoxin Research**, Mainz, v. 9, n. 1, p. 27-34, 1993.
65. VIQUEZ, O.M., CASTELL-PEREZ, M.E., SHELBY, R.A. Occurrence of fumonisin B₁ in maize grow in Costa Rica. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 9, p. 2789-2791, 1996.
66. VISCONTI, A., DOKO, M.B. Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 77, n. 2, p. 546-550, 1994.

67. VISCONTI, A., DOKO, M.B., BOTTALICO, C., SCHURER, B., BOENKE, A. Stability of fumonisins (FB₁ and FB₂) in solution. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 11, n. 4, p. 427-431, 1994.
68. WILSON, T.M., ROSS, P.F., OWENS, D.L., RICE, L.G., GREEN, S.A., JENKINS, S.J., NELSON, H.A. Experimental reproduction of ELEM a study to determine the minimum toxic dose in ponies. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, n. 1-2, p. 115-120, 1992.
69. YAMASHITA, A., YOSHIZAWA, T., AIURA, Y., SANCHEZ, P.C., DIZON, E.I., ARIM, R.H., SARDJONO *Fusarium* mycotoxins (Fumonisin, nivalenol, and zearalenone) and aflatoxins in corn from Southeast Asia. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 59, n. 9, p. 1804-1807, 1995.
70. YOSHIZAWA, T., YAMASHITA, A., CHOKETHAWORN, N. Occurrence of fumonisins and aflatoxins in corn from Thailand. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 2, p. 163-168, 1996.
71. YOSHIZAWA, T., YAMASHITA, A., LUO, Y. Fumonisin occurrence in corn from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 5, p. 1626-1629, May 1994.
72. ZOLLER, O., SAGER, F., ZIMMERLI, B. Vorkommen von fumonisinen in Lebensmitteln. **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, Bern, v. 85, n. 1, p. 81-99, 1994.

Capítulo 4

OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS, OCRATOXINA A E ZEARALENONA EM CULTIVARES DE MILHO NO ESTADO DE SÃO PAULO, SAFRA 1997/1998

OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS, OCRATOXINA A E ZEARALENONA EM CULTIVARES DE MILHO NO ESTADO DE SÃO PAULO, SAFRA 1997/1998

RESUMO

A ocorrência de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, ocratoxina A e zearalenona foi avaliada em 48 genótipos de milho de diferentes tipos de cultivar, de endosperma e duração do ciclo vegetativo. Cento e dez amostras foram avaliadas quanto ao teor de micotoxinas e a influência das condições climáticas e características agrônômicas em três estações experimentais do Estado de São Paulo (Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga), durante a safra 1997/1998. Sessenta amostras (54,5%) foram positivas para aflatoxina B₁ (AFB₁), cinquenta e sete amostras (51,8%) para aflatoxina B₂ (AFB₂), doze amostras (10,9%) para aflatoxina G₁ (AFG₁) e oito amostras (7,3%) para aflatoxina G₂ (AFG₂). Os níveis de aflatoxinas variaram amplamente entre os cultivares analisados, de não detectado (nd) a 1600 µg/kg para AFB₁, de nd a 192 µg/kg para AFB₂, de nd a 280 µg/kg para AFG₁ e de nd a 69 µg/kg para AFG₂. Apenas dois cultivares apresentaram-se contaminados com ocratoxina A (OA) (128 e 206 µg/kg) e somente um com zearalenona (ZEA) (4640 µg/kg), todos provenientes de Capão Bonito. Houve diferença significativa entre os locais de plantio com relação à concentração de aflatoxinas encontradas nas amostras. A alta ocorrência de aflatoxinas em Votuporanga está fortemente associada aos “veranicos” (ausência de chuvas e calor intenso) na fase de florescimento e enchimento dos grãos. Nenhuma correlação foi encontrada entre a concentração de AFB₁ e AFB₂ e tipos de cultivar, de endosperma e duração do ciclo vegetativo. Houve uma interação significativa entre a ocorrência de AFB₁ e AFB₂ e os cultivares, mas não foi possível avaliar a resistência destes genótipos frente a produção destas micotoxinas. Cinquenta e cinco amostras (50%) apresentaram níveis de aflatoxinas acima de 20 µg/kg.

Unitermos: Aflatoxinas, Ocratoxina A, Zearalenona, Ocorrência, Milho.

INTRODUÇÃO

O milho é uma cultura de ampla dispersão geográfica, sendo cultivado em todo o território nacional. Tal aspecto evidencia as diferentes condições climáticas às quais esta cultura está submetida durante o seu desenvolvimento. Além disso, devido à grande variabilidade genética e aos intensos trabalhos de melhoramento genético, o milho é uma cultura que está sempre apresentando modificações nas suas características. Nota-se que cada vez mais há uma substituição dos cultivares de porte alto e ciclo longo por cultivares de porte baixo e de ciclo vegetativo mais precoce, sendo precocidade entendida como o período desde a germinação até o florescimento masculino (BRUNINI, 1997).

O milho está sujeito a contaminação por fungos toxigênicos quando há condições inadequadas de cultivo, colheita, transporte e estocagem (HENNIGEN & DICK, 1995). A contaminação por micotoxinas em grãos de milho é um grande problema nos países em desenvolvimento e que apresentam clima tropical e subtropical. Esta contaminação é responsável por problemas de saúde no homem e em animais (SINHA, 1990).

Os principais gêneros de fungos produtores de micotoxinas são *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. As aflatoxinas são produzidas principalmente por cepas de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Estes organismos são transmitidos para as plantas no campo através do vento e insetos. A produção de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ no campo depende da espécie predominante e está associada ao estresse de seca e danos por insetos (RICHARD et alii, 1993). As aflatoxinas são carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas, representam um risco à saúde pública, havendo pois a necessidade de desenvolver medidas de controle durante o processo de produção de alimentos: cultivo, colheita, armazenamento e transporte (WHO, 1979).

Dentre as micotoxinas produzidas por espécies de *Fusarium* estão a zearalenona, as fumonisinas e os tricotecenos. A zearalenona (ZEA), produzida especialmente pelo *Fusarium*

graminearum, tem sido associada com ação estrogênica e anabólica em várias espécies. A ZEA causa hiperestrogenismo e infertilidade em suínos (MIROCHA & CHRISTENSEN, 1974; PRELUSKY et alii, 1994) e puberdade precoce em humanos (KUIPER-GOODMAN et alii, 1987). Períodos úmidos são suspeitos de causar alta ocorrência de ZEA em milho (BENNETT & ANDERSON, 1978).

A ocorrência da ocratoxina A (OA) em milho foi primeiramente relatada por SHOTWELL et alii (1969). Vários fungos têm sido relacionados como produtores de OA entre eles: *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium viridicatum*, *A. sulphureus* (SCOTT et alii, 1970), *A. melleus* (LAI et alii, 1970) e mais recentemente os fungos: *A. niger* var. *niger* (ABARCA et alii, 1994), *A. fumigatus*, *A. versicolor* e *A. alliaceus* (ABARCA et alii, 1997). A OA é mutagênica, teratogênica e nefrotóxica, principalmente em suínos, e parece estar envolvida na etiologia da nefropatia endêmica dos Balcãs (CASTEGNARO et alii, 1987).

Os principais fatores que favorecem a produção de micotoxinas em milho são: alta umidade, elevadas temperaturas, tempo prolongado de permanência no campo após maturação da espiga, dano mecânico no grão, insetos e flora fúngica (LILLEHOJ & ELLING, 1983; ABRAMSON, 1991).

A prevenção da contaminação por aflatoxinas no milho pode ocorrer através do controle de alguns fatores (ZUBER & LILLEHOJ, 1979): (a) genótipos resistentes à infecção pelo *A. flavus* ou *A. parasiticus* (McMILLIAN et alii, 1982; ZUBER et alii, 1983); (b) genótipos resistentes aos danos causados por insetos e uso de inseticidas e (c) práticas agrícolas para reduzir o estresse da seca incluindo a irrigação e a adequada fertilidade do solo.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento de cultivares de milho plantados em três regiões do Estado de São Paulo quanto a contaminação de aflatoxinas,

zearalenona e ocratoxina A. Foi ainda avaliada a influência das condições climatológicas e das características agronômicas dos cultivares.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Um total de 110 amostras de cultivares de milho foram colhidas em 3 estações experimentais agrícolas do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), localizadas no Estado de São Paulo, Brasil, na safra 1997/1998. Sendo 36 amostras provenientes de Capão Bonito, 36 de Ribeirão Preto e 38 de Votuporanga (Figura 20).



Figura 20 - Estações Experimentais utilizadas em 1997/98 no Estado de São Paulo: Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga.

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi o de látice quadrado, com 36 tratamentos em todas as regiões, com exceção de Votuporanga onde foram incluídos 38 tratamentos. As parcelas foram constituídas de quatro linhas de 5 metros de comprimento, empregando-se as duas centrais para as avaliações. O espaçamento foi de 0,9 m entre linhas e o número de plantas por metro igual a 5. Dos cultivares avaliados, 29 foram comuns nas três regiões, sendo os demais avaliados apenas em cada região (Tabela 15).

As datas de plantio foram 16/10/97, 02/12/97 e 17/11/97 e as de colheita foram 16/03/98, 13/04/98 e 26/03/98 em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, respectivamente.

Após a colheita, o milho obtido foi seco, debulhado e homogeneizado para retirada de uma amostra de 500 g. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em temperatura de -18°C até o momento da análise laboratorial.

Dados climatológicos

Os dados climatológicos foram fornecidos pelo Centro de Climatologia do Instituto Agronômico de Campinas (IAC). Os seguintes parâmetros foram analisados: índice pluviométrico diário, temperatura mínima, temperatura média e temperatura máxima diários.

Tabela 15 - Características dos cultivares de milho avaliados no Estado de São Paulo na safra de 1997/1998.

Cultivar	Empresa	Tipo de cultivar	Endosperma	Ciclo vegetativo
<i>comuns a todos os campos experimentais</i>				
Agromen 2012	Agromen	Híbrido duplo	Semidentado	Superprecoce
AL 30	CATI	Variedade	Semidentado	Normal
AL 34	CATI	Variedade	Semidentado	Normal
AS 3466	Agroeste	Híbrido triplo	Duro	Precoce
Avant	Novartis	Híbrido simples	Semiduro	Precoce
BR 3123	Unimilho	Híbrido triplo	Semiduro	Precoce
C 333B	Cargill	Híbrido simp. mod.	Semiduro	Normal
C 435	Cargill	Híbrido duplo	Semiduro	Precoce
C 444	Cargill	Híbrido duplo	Semiduro	Precoce
C 505	Cargill	Híbrido triplo	Semidentado	Precoce
C 806	Cargill	Híbrido triplo	Semiduro	Superprecoce
C 909	Cargill	Híbrido simples	Semiduro	Superprecoce
CO 32	Colorado	Híbrido triplo	Semiduro	Precoce
CO 42	Colorado	Híbrido duplo	Semiduro	Precoce
CO 9560	Colorado	Híbrido simples	Semiduro	Precoce
Dina 1000	Dinamilho	Híbrido simp. mod.	Semiduro	Precoce
Dina 766	Dinamilho	Híbrido simp. mod.	Semiduro	Superprecoce
Exceler	Novartis	Híbrido triplo	Semidentado	Precoce
Master	Novartis	Híbrido triplo	Dentado	Normal
MR 2601	Ribeiral	Híbrido simples	Duro	Precoce
P 3041	Pioneer	Híbrido triplo	Duro	Precoce
Savana	Novartis	Híbrido triplo	Semiduro	Normal
XL 251	Braskalb	Híbrido simples	Semiduro	Precoce
XL 345	Braskalb	Híbrido triplo	Semiduro	Precoce
XL 360	Braskalb	Híbrido triplo	Duro	Precoce
Z 8392	Zeneca	Híbrido simples	Semiduro	Superprecoce
Z 8440	Zeneca	Híbrido triplo	Semiduro	Precoce
Z 8474	Zeneca	Híbrido simples	Semiduro	Precoce
Z 8501	Zeneca	Híbrido triplo	Semidentado	Precoce
<i>Avaliados em Capão Bonito</i>				
AG 1043	Agrocere	Híbrido duplo	Semidentado	Normal
AG 1051	Agrocere	Híbrido duplo	Dentado	Normal
AG 5011	Agrocere	Híbrido triplo	Semidentado	Precoce
BR 2121	Embrapa	Híbrido duplo	Semiduro	Precoce
FT 9043	FT/Balu	Híbrido triplo	Semiduro	Precoce
P 3071	Pioneer	Híbrido triplo	Duro	Precoce
XL 269	Braskalb	Híbrido simples	Duro	Precoce
<i>Avaliados em Ribeirão Preto</i>				
AG 1051	Agrocere	Híbrido duplo	Dentado	Normal
AG 4051	Agrocere	Híbrido duplo	Dentado	Normal
FT 9043	FT/Balu	Híbrido triplo	Semiduro	Precoce
IAC TAIUBA	IAC	Variedade	Semidentado	Precoce
P 3021	Pioneer	Híbrido triplo	Semiduro	Normal
XL 660	Braskalb	Híbrido duplo	Semidentado	Precoce
Zeneca 8452	Zeneca	Híbrido simples	Semidentado	Precoce
<i>Avaliados em Votuporanga</i>				
AG 1043	Agrocere	Híbrido duplo	Semidentado	Normal
AG 106	Agrocere	Híbrido duplo	Semidentado	Normal
AG 3010	Agrocere	Híbrido duplo	Duro	Superprecoce
AG 405	Agrocere	Híbrido duplo	Semiduro	Precoce
AG 519	Agrocere	Híbrido duplo	Semidentado	Precoce
BR 201	Embrapa	Híbrido duplo	Semidentado	Precoce
Dina 657	Dinamilho	Híbrido simp. mod.	Semiduro	Precoce
G 500	Novartis	Híbrido triplo	Semidentado	Precoce
XL 660	Braskalb	Híbrido duplo	Semidentado	Precoce

Padrões analíticos

Os padrões de micotoxinas foram obtidos da Sigma Chemical Co. (EUA) e o preparo das soluções padrão estoque e de uso foi realizado segundo o descrito no Manual de Métodos Oficiais de Análises da AOAC (AOAC, 1995).

A partir de soluções estoque individuais para cada toxina e após a determinação das concentrações exatas por espectrometria no UV, foi preparada a solução de trabalho com uma mistura das toxinas: 5 µg/mL para aflatoxina B₁ e G₁; 1,5 µg/mL para aflatoxina B₂ e G₂; 10 µg/mL para ocratoxina A e 40 µg/mL para zearalenona em benzeno.

Preparação das amostras

As amostras de milho foram trituradas em moinho até atingirem um tamanho entre 250-500 mesh.

Extração e limpeza

A determinação de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona foi realizada segundo o método de SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA (1989) por cromatografia em camada delgada. Cinquenta gramas da amostra foram homogeneizadas em liquidificador com 270 mL de metanol e 30 mL de cloreto de potássio 4% durante 5 minutos. A mistura foi filtrada em papel filtro comum. Cento e cinquenta mL do filtrado foram transferidos para um bécker onde foram adicionados 150 mL do agente clarificante (sulfato de amônio 30%) e 50 mL de Celite durante 5 minutos. A mistura foi filtrada em papel filtro comum. Cento e cinquenta mL do filtrado foram transferidos para um funil de separação e adicionado de 150 mL de água e particionado 2 vezes com 10 mL de clorofórmio.

Triagem e quantificação por cromatografia em camada delgada

Foram combinados 5 mL da primeira e da segunda partição de clorofórmio. Evaporou-se à secura em banho de água a 80°C. O resíduo foi dissolvido em 200 µL de benzeno.

Para triagem, foram aplicados 5 µL do extrato na cromatoplaca (silicagel 60, Merck) a 2 cm da base. Os padrões foram aplicados separadamente. A placa foi colocada em uma cuba não saturada contendo tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (60:40:0,5-v/v/v). As aflatoxinas e ocratoxina A foram visualizadas por incidência da luz UV longa. Depois a cromatoplaca foi revelada com cloreto de alumínio, aquecida a 110°C durante 5 minutos, e observada em UV longo para avaliar a presença de zearalenona. As amostras com manchas de mesma coloração e valor de R_f semelhante aos padrões foram consideradas presuntivas positivas e foram submetidas a quantificação e confirmação.

Para quantificação, foram aplicados volumes conhecidos de amostra e padrões nas cromatoplas. Para quantificação de aflatoxinas as placas foram desenvolvidas em clorofórmio-acetona (9:1-v/v), para ocratoxina A foi usado o tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (5:4:1-v/v/v) como fase móvel e para zearalenona foi utilizado o tolueno-acetato de etila-ácido fórmico (60:40:0,5-v/v/v) e posterior revelação com cloreto de alumínio. Os cálculos foram realizados de acordo com o Manual de Métodos Oficiais de Análises da AOAC (AOAC, 1995).

Confirmação

A confirmação para aflatoxina B₁ foi através da reação com ácido trifluoroacético de acordo com o procedimento descrito por PRZYBYLSKI (1975). A ocratoxina A foi confirmada por derivação com trifluoreto de boro, de acordo com o procedimento de HUNT et alii (1980). A zearalenona foi confirmada por acetilação com anidrido acético:piridina (GOLINSKI & GRABARKIEWICZ-SZCZENA, 1984).

Descontaminação do material

Todo o material utilizado foi descontaminado com uma solução concentrada de hipoclorito de sódio comercial, por 24 horas. Após a descontaminação o material foi lavado normalmente, enxaguado com água destilada e seco à temperatura ambiente.

Análise estatística

Antes da análise de variância, os dados comuns entre as 3 regiões foram transformados pela raiz quadrada $(x + 1)^{1/2}$, para igualar as variâncias da ocorrência de aflatoxina B₁ e B₂ em cultivares de milho. Os dados originais (não transformados) estão apresentados nas Tabelas 16, 17, 18, 19 e 20. Para determinar as diferenças entre os cultivares e os locais de plantio foi realizado o teste de Tukey com 5 e 1% do nível de probabilidade. A correlação entre micotoxinas e os dados climatológicos e características dos cultivares foi calculada. Os dados foram analisados através do programa “Sistema de Análise Estatística” (SANEST) desenvolvido por Elio Prado Zonta e Amauri Almeida Machado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As aflatoxinas foram detectadas em 54,5% (60/110) de todas as amostras analisadas, em uma concentração total (AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂) variando de 6,2 a 1792 µg/kg. Os resultados estão resumidos nas Tabelas 16, 17 e 18. Entre as amostras positivas, sessenta (54,5%) apresentaram a AFB₁ em concentração variando de 6,2 a 1600 µg/kg, cinquenta e sete (51,8%) continham AFB₂ em concentração entre 1,9 a 192 µg/kg, doze (10,9%) continham AFG₁ em concentração entre 25 a 254 µg/kg, e oito (7,3%) continham AFG₂ em concentração entre 7 a 58 µg/kg.

Tabela 16 - Níveis de micotoxinas detectados em 36 cultivares de milho plantado em Capão Bonito, SP, safra 1997/1998.

Cultivar	Micotoxinas ($\mu\text{g/kg}$)					
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	Ocratoxina A	Zearalenona
AG 1043	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
AG 1051	6,20 c	nd d	nd	nd	nd	nd
AG 5011	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
Agromen 2012	27,27 a	6,04 a	254	58	nd	nd
AL 30	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
AL 34	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
AS 3466	nd d	nd d	nd	nd	206	nd
Avant	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
BR 2121	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
BR 3123	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
C 333B	nd d	nd d	nd	nd	nd	4640
C 435	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
C 444	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
C 505	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
C 806	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
C 909	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
CO 32	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
CO 42	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
CO 9560	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
Dina 1000	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
Dina 766	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
Exceler	12,30 b	nd d	nd	nd	nd	nd
FT 9043	nd d	nd d	nd	nd	128	nd
Master	17,95 b	3,70 b	nd	nd	nd	nd
MR 2601	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
P 3041	6,20 c	1,90 c	nd	nd	nd	nd
P 3071	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
Savana	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
XL 269	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
XL 251	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
XL 345	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
XL 360	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
Z 8392	6,20 c	1,90 c	39	26	nd	nd
Z 8440	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
Z 8474	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd
Z 8501	nd d	nd d	nd	nd	nd	nd

Resultados referem-se a média de duplicatas.

nd - não detectado. Limites de detecção: Aflatoxinas= 2 $\mu\text{g/kg}$; ocratoxina A= 5 $\mu\text{g/kg}$ e zearalenona= 55 $\mu\text{g/kg}$.

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste Tukey (dms= 0,82824 para AFB₁ e 0,24263 para AFB₂)

Tabela 17 - Níveis de aflatoxinas detectados em 36 cultivares de milho plantado em Ribeirão Preto, SP, safra 1997/1998.

Cultivar	Aflatoxinas ($\mu\text{g/kg}$)			
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
AG 1051	183 b-e	30 d	nd	Nd
AG 4051	nd i	nd f	nd	nd
Agromen 2012	nd i	nd f	nd	nd
AL 30	56 gh	7 e	nd	nd
AL 34	28 h	7 e	nd	nd
AS 3466	135 d-f	15 e	nd	nd
Avant	46 gh	7 e	nd	nd
BR 3123	218 b-d	30 d	99	15
C 333B	251 bc	47 bc	25	nd
C 435	262 bc	34 cd	nd	nd
C 444	99 fg	7 e	25	nd
C 505	nd i	nd f	nd	nd
C 806	nd i	nd f	nd	nd
C 909	nd i	nd f	nd	nd
CO 32	nd i	nd f	nd	nd
CO 42	nd i	nd f	nd	nd
CO 9560	208 b-d	35 cd	49	7
Dina 1000	101 e-g	10 e	nd	nd
Dina 766	251 bc	34 cd	99	15
Exceler	251 bc	35 cd	25	nd
FT 9043	nd i	nd f	nd	nd
IAC TAIUBA	520 a	120 a	112	15
Master	nd i	nd f	nd	nd
MR 2601	nd i	nd f	nd	nd
P 3041	nd i	nd f	nd	nd
P 3021	nd i	nd f	nd	nd
Savana	251 bc	30 d	112	26
XL 251	99 fg	15 e	nd	nd
XL 345	160 c-f	15 e	nd	nd
XL 360	nd i	nd f	nd	nd
XL 660	289 b	55 b	25	11
Z 8392	101 e-g	15 e	nd	nd
Z 8440	nd i	nd f	nd	nd
Z 8474	25 h	7 e	25	nd
Z 8452	nd i	nd f	nd	nd
Z 8501	25 h	7 e	nd	nd

Resultados referem-se a média de duplicatas.

nd - não detectado.

Limite de detecção para aflatoxinas de 2 $\mu\text{g/kg}$.

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste Tukey (dms = 3,53028 para AFB₁ e 1,32182 para AFB₂)

Tabela 18 - Níveis de aflatoxinas detectados em 38 cultivares de milho plantado em Votuporanga, SP, safra 1997/1998.

Cultivar	Aflatoxinas ($\mu\text{g/kg}$)	
	AFB ₁	AFB ₂
AG 1043	121 g-i	12 g-k
AG 106	800 cd	77 b-d
AG 3010	nd j	nd k
AG 405	1600 a	192 a
AG 519	208 f-h	19 f-j
Agromen 2012	135 gh	6 jk
AL 30	183 gh	34 d-i
AL 34	1436 a	83 bc
AS 3466	70 hi	9 h-k
Avant	nd j	nd k
BR 201	617 cd	55 b-f
BR 3123	99 g-i	6 jk
C 333B	914 bc	93 b
C 435	135 gh	12 g-k
C 444	1436 a	108 b
C 505	820 c	82 bc
C 806	183 gh	9 h-k
C 909	117 g-i	7 i-k
CO 32	99 g-i	12 g-k
CO 42	183 gh	35 d-h
CO 9560	452 d-f	29 e-j
Dina 1000	160 gh	15 f-j
Dina 657	1600 a	69 b-e
Dina 766	208 f-h	7 i-k
Exceler	nd j	nd k
G 500	nd j	nd k
Master	135 gh	10 h-k
MR 2601	nd j	nd k
P 3041	135 gh	7 i-k
Savana	1305 ab	86 bc
XL 251	99 g-i	7 i-k
XL 345	276 e-g	10 h-k
XL 360	117 g-i	12 g-k
XL 660	251 fg	40 c-g
Z 8392	272 e-g	22 f-j
Z 8440	18 ij	nd k
Z 8474	160 gh	7 i-k
Z 8501	560 c-e	73 b-d

Resultados referem-se a média de duplicatas.

nd - não detectado. Limite de detecção para aflatoxinas de 2 $\mu\text{g/kg}$

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste Tukey (dms = 7,25744 para AFB₁ e 3,00884 para AFB₂)

Os níveis de aflatoxinas variaram amplamente entre as épocas de plantio de milho analisados, de nd (não detectado) a 1600 µg/kg (concentração média de 168±339 e mediana de 18 µg/kg) para AFB₁, de nd a 192 µg/kg (17±31 e 3 µg/kg) para AFB₂, de nd a 280 µg/kg (8±32 e nd) para AFG₁ e de nd a 68,6 µg/kg (2±7 e nd) para AFG₂ (Tabelas 16, 17 e 18).

As maiores médias de contaminação foram encontradas na Estação Experimental do Instituto Agrônomo em Votuporanga e Ribeirão Preto, com várias amostras excedendo a 20 µg/kg (50% das amostras), limite estabelecido pelo Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária para a somatória das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, acompanhando o que foi estabelecido para os países do Mercosul (BRASIL, 1996).

A análise de variância para aflatoxina B₁ e B₂ dos cultivares comuns das 3 estações experimentais estudadas mostrou haver uma forte interação entre contaminação por aflatoxinas com o local de plantio e o cultivar.

A média dos níveis de AFB₁ e AFB₂, 232 e 19 µg/kg respectivamente para amostras provenientes de Votuporanga foi significativamente maior (P<0,05 e 0,01) do que amostras provenientes de Ribeirão Preto e Capão Bonito. Havendo também diferenças significativas entre as regiões de Ribeirão Preto e Capão Bonito (Tabela 19).

Tabela 19 - Concentração média das aflatoxinas B₁ e B₂ em três regiões diferentes do Estado de São Paulo, Brasil, safra 1997/1998.

Local	Aflatoxinas (µg/kg)		teste de Tukey	
	AFB ₁	AFB ₂	5%	1%
Votuporanga	232	19	a	A
Ribeirão Preto	54	8	b	B
Capão Bonito	1	0,3	c	C

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste Tukey (dms = 0,55217 para AFB₁ e 0,21913 para AFB₂) e de 1% (dms = 0,69217 para AFB₁ e 0,27469 para AFB₂)

Os níveis comparativamente alto e baixo em Votuporanga e Capão Bonito, respectivamente, parece estar associado com as condições climáticas de cada região (Tabela 20 e Figura 21). A alta ocorrência de aflatoxinas em Votuporanga parece estar associada aos “veranicos” (ausência de chuvas e calor intenso) na fase de florescimento e enchimento dos grãos, responsável pelo estresse da cultura de milho. Vários autores (BROWN et alii, 1993; PAYNE et alii, 1986 e 1988; SCOTT & ZUMMO, 1988; THOMPSON et alii, 1980; ZUBER et alii, 1983; ZUBER & LILLEHOJ, 1979) citam que o estresse da planta, especialmente durante o período de enchimento do grão, afeta o nível de aflatoxinas. BROWN et alii (1993) verificaram que a invasão das sementes de milho é favorecida pelas quebras do endosperma, este aumento ocorre em períodos de seca e alta temperatura onde a viabilidade do embrião é reduzida. Em Votuporanga, as temperaturas máximas diárias observadas foram acima de 30°C. KARUNARATNE et alii (1990), LILLEHOJ et alii (1975 e 1980a), PAYNE et alii (1988), RAMAKRISHNA et alii (1990), SCHMITT & HURBURGH (1989), THOMPSON et alii (1980), VIQUEZ et alii (1994), ZUBER & LILLEHOJ (1979) mostraram que temperatura elevada foi o principal fator responsável pelo aumento de aflatoxinas em milho. JONES et alii (1980) e PAYNE et alii (1988) demonstraram experimentalmente que o máximo de contaminação por *Aspergillus flavus* em sementes de milho ocorre em temperaturas de 30 a 38°C.

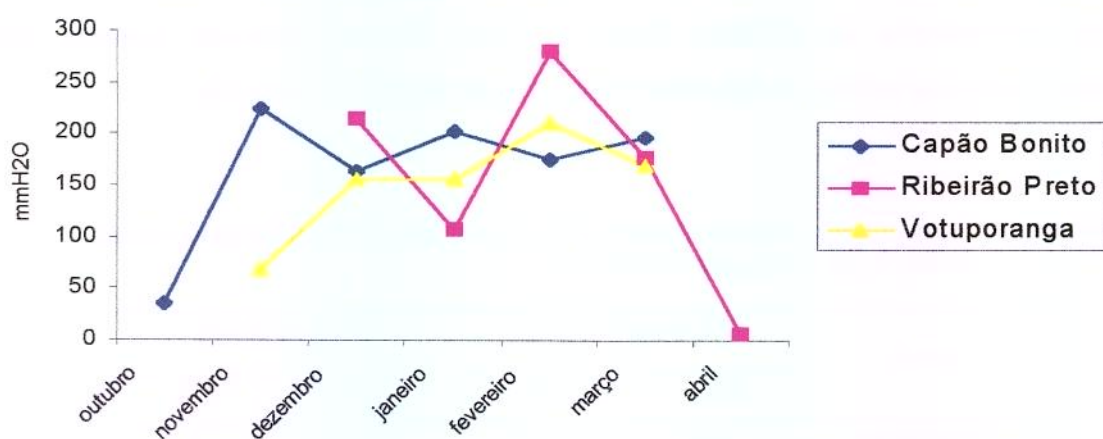


Figura 21 - Índice pluviométrico (mmH₂O) entre o período de plantio e colheita de milho no Estado de São Paulo nas estações experimentais de Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, safra 1997/1998.

Tabela 20 - Dados climatológicos das estações experimentais do Instituto Agronômico de Campinas: temperatura mínima, temperatura média e temperatura máxima (°C) no período de Outubro de 1997 a Abril de 1998.

Localidade		Mês						
		Outubro	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril
<i>Capão Bonito</i>	temperatura mínima	15,0	19,3	18,3	20,9	19,0	18,4	-
	temperatura média	20,3	23,5	23,7	25,5	23,5	23,1	-
	temperatura máxima	25,6	27,6	29,1	30,0	28,0	27,9	-
<i>Ribeirão Preto</i>	temperatura mínima	-	-	19,9	20,4	20,7	19,7	17,8
	temperatura média	-	-	25,1	25,7	25,6	25,3	23,7
	temperatura máxima	-	-	30,3	31,1	30,6	30,9	29,6
<i>Votuporanga</i>	temperatura mínima	-	21,1	21,0	21,2	21,4	21,0	-
	temperatura média	-	26,6	26,5	27,0	26,7	26,5	-
	temperatura máxima	-	32,1	32,0	32,9	31,9	32,1	-

Tabela 21 - Níveis médios de aflatoxinas B₁ e B₂ em cultivares de milho avaliados simultaneamente nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico de Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, safra 1997/1998.

Cultivar	aflatoxinas			
	AFB ₁ (µg/kg)		AFB ₂ (µg/kg)	
Agromen 2012	35	h-l	3	h-k
AL 30	54	f-j	10	d-g
AL 34	217	bc	18	b-d
AS 3466	44	h-l	6	f-j
Avant	8	m-o	2	jk
BR 3123	73	e-h	8	e-h
C 333B	246	ab	33	a
C 435	92	d-g	11	d-f
C 444	265	ab	22	a-c
C 505	103	de	13	c-f
C 806	26	i-m	2	i-k
C 909	17	k-n	2	jk
CO 32	15	l-n	2	i-k
CO 42	26	i-m	6	f-j
CO 9560	149	cd	16	cd
Dina 1000	62	e-i	7	f-i
Dina 766	108	de	10	d-g
Exceler	46	h-k	6	f-j
Master	31	i-m	4	h-j
MR 2601	nd	o	nd	k
P 3041	25	j-m	2	i-k
Savana	311	a	27	ab
XL 251	47	g-k	6	f-j
XL 345	101	d-f	7	f-i
XL 360	17	k-n	2	i-k
Z 8392	95	d-f	11	d-f
Z 8440	3	no	nd	k
Z 8474	38	h-l	4	g-j
Z 8501	97	d-f	16	c-e

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste Tukey (dms = 2,77599 para AFB₁ e 1,10167 para AFB₂)

Os resultados médios da ocorrência de AFB₁ e AFB₂ nos cultivares de milho avaliados simultaneamente nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga estão apresentados na Tabela 21. Houve uma interação significativa (1% pelo teste F) entre a ocorrência de AFB₁ e AFB₂ e os cultivares.

Apesar de utilizarmos a técnica de infecção natural para avaliar a resistência dos cultivares frente a produção de aflatoxinas, foi possível observar que o cultivar MR 2601 foi o único a não apresentar contaminação por AFB₁ e AFB₂ nos três diferentes locais avaliados. SCOTT & ZUMMO (1990) e ZUBER & LILLEHOJ (1979) observaram que a identificação de genótipos resistentes ao *A. flavus* e produção de aflatoxinas tem mostrado pouca repetibilidade pois depende do local e de avaliação anual. Os principais fatores que levam a esta variabilidade dos resultados deve-se ao método de amostragem, método de infecção (natural ou inóculo) e fatores ambientais de um dado local e ano. Portanto, é difícil concluir que o híbrido MR 2601 seja realmente resistente a contaminação por aflatoxinas, sendo necessário uma avaliação mais rigorosa.

Estudos realizados nos Estados Unidos demonstraram que nenhum cultivar tem apresentado resistência completa ao acúmulo de aflatoxinas, mas há uma variação ampla dos níveis encontrados nas amostras. Entretanto, a susceptibilidade dos híbridos está relacionada aos fatores que caracterizam a resistência, como: endosperma rico em lisina ou amilose (LILLEHOJ et alii, 1980b), presença de hidroxamatos cíclicos e fenóis (HAMMERSCHMIDT & NICHOLSON, 1977, KLUN et alii, 1970), inibidor de tripsina (CHEN & MITCHELL, 1973), conteúdo de voláteis C₆-C₁₂ (ZERINGUE, 1997); superfície do grão (BROWN et alii, 1993 e GUO et alii, 1998) e inibidores de proteínas (HUANG et alii, 1997; GUO et alii, 1996).

Os cultivares Avant, C 909, CO 32, MR 2601, XL 360 e Zeneca 8440 apresentaram níveis médios de AFB₁ e AFB₂ inferiores a 20 ppb (Tabela 21). Estes dados mostram que estes cultivares provavelmente apresentaram uma certa resistência à produção de

aflatoxinas em relação aos demais. Já os cultivares SAVANA, C 444 e C 333B estavam altamente contaminados com aflatoxinas. Entretanto, para a identificação de plantas resistentes à produção de aflatoxinas seriam necessários estudos complementares, como: avaliar o tempo de colheita após a maturação da semente, diferença comportamental do cultivar em locais diferentes, avaliação anual e usar um número maior de replicatas.

Na revisão realizada por GORMAN & KANG (1991), foi observado que a produção de aflatoxinas parece estar associada com o controle genético, mas é também influenciada pelo ambiente. Fazem-se necessários estudos genéticos utilizando um grande número de cultivares para a elucidação da resistência. Características genéticas que contribuem para a resistência à produção de aflatoxinas incluem: (a) resistência à seca e (b) resistência aos fungos (esporos aéreos). Entretanto, a avaliação de cultivar no campo é altamente cara e são necessários no mínimo dois anos consecutivos de estudos.

Os resultados demonstraram que não há relação entre a contaminação por aflatoxinas e tipo de cultivar. A figura 22 demonstra que os cultivares tipo variedade estavam mais contaminados por aflatoxinas nos campos experimentais de Ribeirão Preto e Votuporanga, enquanto em Capão Bonito, os híbridos duplos estavam mais contaminados. Para se chegar a um dado conclusivo seria necessário utilizar um maior número de amostras do tipo variedade, pois dentro do universo analisado apenas dois cultivares, AL 30 e AL 34, são deste tipo, os demais são híbridos. No entanto, os nossos dados coincidem com os de ZUBER et alii (1983), no qual os híbridos parecem ser menos propensos a contaminação com aflatoxinas do que as variedades. Entretanto, os níveis médios de AFB₁ encontrada nos híbridos e variedades foram superiores a 20 µg/kg, mas significativamente diferente ($P < 0,05$), 63 µg/kg para os híbridos e 214 µg/kg para os tipo variedade.

Apesar dos resultados na Tabela 21 sugerirem que os cultivares com endosperma duro e semiduro são mais resistentes à produção de aflatoxinas, a figura 23 mostra que não há

correlação entre o tipo de endosperma e contaminação por aflatoxinas. Os cultivares com endosperma dentado, semi-dentado e semi-duro estavam mais contaminados, respectivamente nas Estações Experimentais de Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga. Nossos dados assemelham-se aos de LILLEHOJ et alii (1975 e 1980b) que não encontraram diferenças significativas na concentração de aflatoxinas observadas em dois tipos de endosperma (duro e dentado).

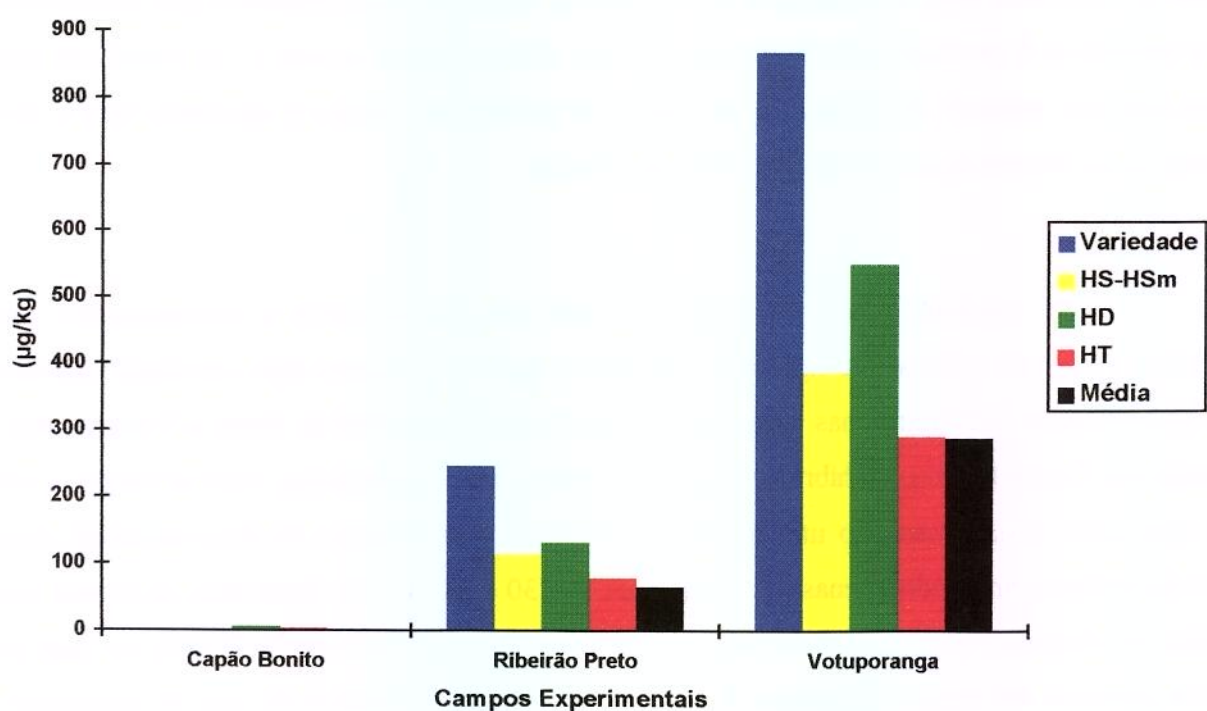


Figura 22 - Concentração média de aflatoxinas B₁ + B₂ em cultivares de milho com diferentes tipos de cultivar nos campos experimentais do Instituto Agrônomo em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, safra 1997/1998. (HS = híbrido simples; HSm = híbrido simples modificado; HD = híbrido duplo; HT = híbrido triplo).

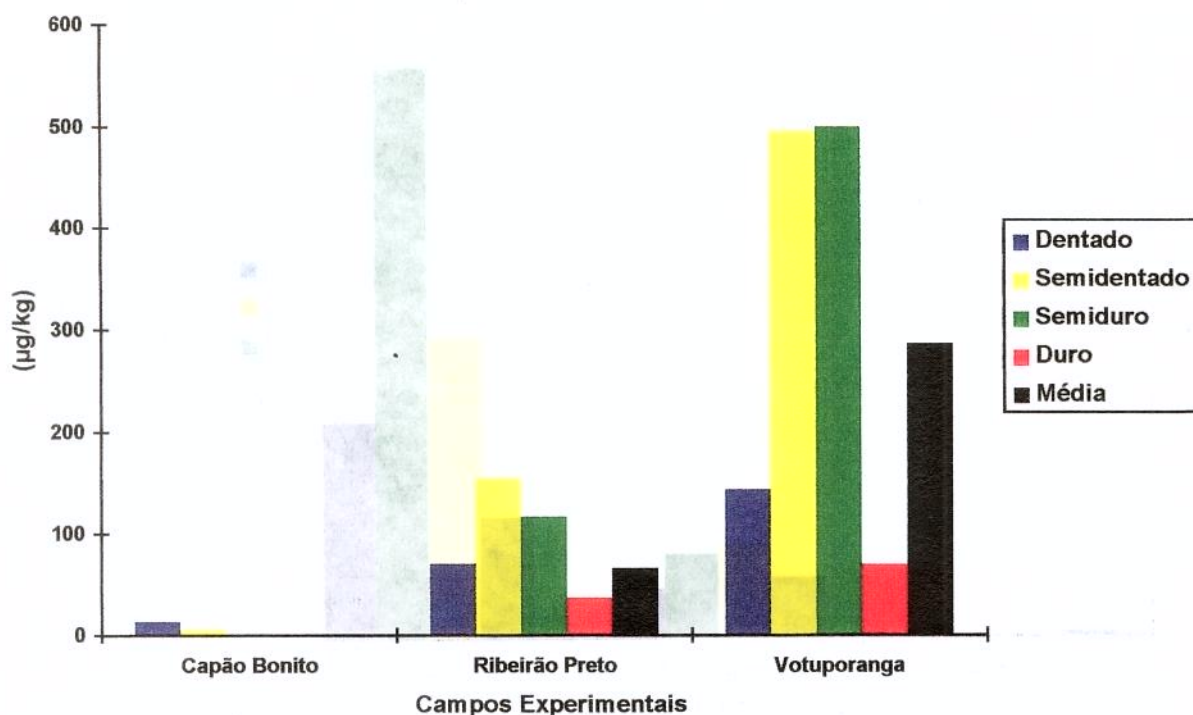


Figura 23 - Concentração média de aflatoxinas B₁ + B₂ em cultivares de milho com diferentes tipos de endosperma nos campos experimentais do Instituto Agrônomo em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, safra 1997/1998.

BORGEMEISTER et alii (1998), HELL et alii (1996) e VIQUEZ et alii (1994) mostraram que a fase de colheita tem um efeito importante nos níveis de aflatoxinas. Quanto menor o tempo de permanência da espiga no campo após o período de maturação, menor o nível de contaminação por aflatoxinas. Uma vez que a colheita foi realizada na mesma época para todos os cultivares, esperava-se que a contaminação por estas micotoxinas fossem maiores nos cultivares de ciclo superprecoce e precoce, pois estes permaneceram mais tempo no campo em relação aos cultivares de ciclo normal. Mas, pode-se observar que não houve esta relação, principalmente em Votuporanga, onde as amostras de ciclo normal apresentaram concentrações médias de AFB₁ e AFB₂ superiores as de ciclo superprecoce e precoce, conforme a figura 24.

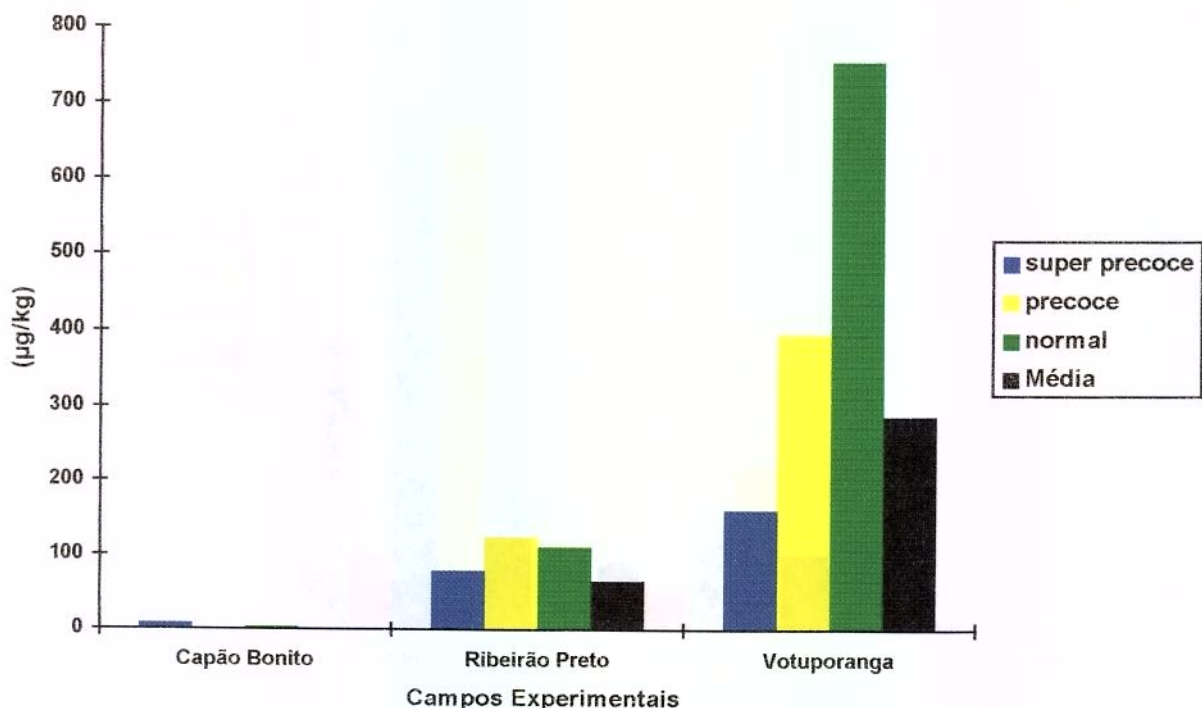


Figura 24 - Concentração média de aflatoxinas B₁ + B₂ em cultivares de milho com diferentes tipos de ciclo vegetativo nos campos experimentais do Instituto Agrônomo em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, safra 1997/1998.

Em Capão Bonito, observaram-se elevados índices de acamamento e quebra de plantas (DUARTE & PATERNIANI, 1998), principalmente nos cultivares AL 30, BR 2121, C 505, Dina 1000 e FT 9043, no entanto, nenhum destes cultivares apresentaram contaminação por aflatoxinas. Em Ribeirão Preto, os cultivares Agromen 2012, AL 30, Avant, BR 3123, C 444, C 505, Dina 1000, MR 2601, XL 251, XL 345, XL 360, XL 660, Zeneca 8392 e Zeneca 8440, apresentaram os maiores índices de plantas acamadas e quebradas. Com exceção dos cultivares Agromen 2012, C 505, MR 2601, XL 360 e Zeneca 8440, todos os outros apresentaram níveis de contaminação por aflatoxinas acima de 20 µg/kg. Em Votuporanga, os cultivares AL 34, C 505, G 500, MR 2601 e Zeneca 8440 mostraram os maiores índices de plantas acamadas e quebradas, no entanto, com exceção dos cultivares G 500, MR 2601 e Zeneca 8440, todos os outros apresentaram níveis de contaminação por aflatoxinas extremamente elevados. Portanto, não

houve interação entre índice de acamamento e quebra de plantas com níveis de contaminação por aflatoxinas.

Na safra 1997/1998, ocorreram o complexo enfezamento/mosaico, a ferrugem comum, o carvão e a podridão por *Fusarium* spp em espigas (DUARTE & PATERNIANI, 1998). Em Votuporanga, os cultivares AG 106, Avant, C 909, C 806 e Dina 766 mostraram um número maior que 10% de plantas com sintomas de enfezamento. Com exceção do cultivar Avant, todos os outros apresentaram níveis de contaminação por aflatoxinas acima de 20 µg/kg. O complexo enfezamento/mosaico foi constatado em 40% dos cultivares de Votuporanga, principalmente nos cultivares AG 106, AG 1043, AL 30, AL 34, AS 3466, Avant, BR 3123, C 333 B, C 435, C 444, Dina 1000, G 500, Master, P 3041, Savana, XL 251, XL 345, XL 360, Zeneca 8392, Zeneca 8474 e Zeneca 8501. Destes cultivares, apenas o cultivar Avant e G 500 não apresentaram contaminação por aflatoxinas. Com estes dados, nota-se que a ocorrência de aflatoxinas foi aleatória em cultivares de milho com ou sem enfezamento ou complexo enfezamento/mosaico.

Em Capão Bonito, ocorreu a ferrugem comum, causada pela *Puccinia sorghi* com uma severidade que variou de 1 a 50% de área foliar afetada (DUARTE & PATERNIANI, 1998). Os principais cultivares afetados foram: AG 1051, Agromen 2012, AL 30, AL 34, AS 3466, Avant, BR 2121, BR 3123, C 333 B, C 435, C 444, C 505, C 806, C 909, CO 9560, Dina 766, Dina 1000, Exceler, FT 9043, MR 2601, P 3041, Savana, XL 345, Zeneca 8392, Zeneca 8440, Zeneca 8474 e Zeneca 8501. Destas, apenas os cultivares AG 1051, Agromen 2012, Exceler e Zeneca 8392 apresentaram-se contaminados com aflatoxinas, mas com níveis acima de 20 µg/kg somente o cultivar Agromen 2012. Portanto, não houve correlação entre a contaminação do cultivar por aflatoxinas e a presença da *Puccinia sorghi*.

Com relação a espigas com grãos afetados por *Fusarium* spp, a maior ocorrência ocorreu em Capão Bonito, onde variou de 10% no CO 42, a 88% no cultivar XL 345 (DUARTE & PATERNIANI, 1998). As condições climáticas da região de Capão Bonito favorecem o

desenvolvimento do *Fusarium moniliforme* e não do *Aspergillus flavus*. ZUMMO & SCOTT (1992) encontraram poucas sementes infectadas com *A. flavus* e baixas concentrações de aflatoxinas em milho que haviam sido inoculados com ambos fungos do que em milho inoculado com *A. flavus* somente. Eles concluíram que o *F. moniliforme* pode inibir a infecção pelo *A. flavus* e consequentemente diminui a concentração de aflatoxinas. Segundo CHOUDHARY (1992), as razões pelas quais há diminuição do nível de aflatoxinas podem ser devido a um ou a combinação dos seguintes fatores: (1) competição física da flora fúngica por espaços e nutrientes; (2) os fungos podem competir com *A. flavus* pelo substrato requerido para a produção da toxina; (3) presença de outros fungos podem favorecer uma mudança no ambiente bioquímico influenciando no passo metabólico do fungo toxigênico; (4) degradação da aflatoxina após sua formação. Realmente a região de Capão Bonito foi a que apresentou menor contaminação por aflatoxinas conforme a Tabela 19.

Em contraste com a alta ocorrência e níveis de AFB₁ e AFB₂ nas amostras analisadas, a AFG₁ e AFG₂ foram somente detectadas em 12 (11%) de 110 amostras; duas de Capão Bonito e dez de Ribeirão Preto. Com níveis variando de nd a 254 µg/kg para AFG₁ e nd a 58 µg/kg para AFG₂ e níveis médios de 8 e de 3 para AFG₁ e AFG₂, respectivamente. Estas micotoxinas não foram detectadas em amostras de Votuporanga; indicando que o *Aspergillus parasiticus*, produtor das AFG₁ e AFG₂, provavelmente não infectou as sementes de milho nesta região (DIENER & DAVIS, 1987), ou as condições climáticas seguintes a infecção não conduziram a produção destas micotoxinas. Estes resultados foram semelhantes aos apresentados por GORMAN et alii (1992) em algumas regiões do Nordeste dos Estados Unidos e por CARVAJAL & ARROYO (1997) na região de Las Yescas no México.

Apenas dois cultivares, AS 3466 e FT 9043, provenientes de Capão Bonito encontravam-se contaminados com ocratoxina A (OA). Os níveis encontrados foram de 128 e 206 µg/kg para o cultivar FT 9043 e AS 3466, respectivamente.

SHOTWELL et alii (1969 e 1970) relataram pela primeira vez a presença de OA em uma amostra de milho das 283 analisadas da safra de 1967 nos Estados Unidos. O nível apresentado foi de 110-150µg/kg, semelhante ao resultado encontrado nos cultivares acima. A OA é produzida principalmente após a colheita do milho, segundo ABRAMSON et alii (1992), onde os principais fatores são: umidade (~19%), temperatura (~28°C), tempo de estocagem (acima de 16 semanas), danos mecânicos do grão, insetos, flora fúngica, prevalência de cepas toxigênicas e interações microbiológicas. Entretanto, foi possível verificar que as amostras analisadas apresentaram uma contaminação pré-colheita.

Há poucos dados sobre a ocorrência desta micotoxina em milho no Brasil. Nenhuma das 23 amostras de milho estocados no Rio Grande do Sul encontraram-se contaminadas por OA (HENNIGEN & DICK, 1995), bem como as sete amostras de grãos de milho provenientes do Paraná (MILANEZ et alii, 1998).

A zearalenona (ZEA) foi registrada em somente uma amostra de milho proveniente de Capão Bonito, na concentração de 4640 µg/kg. Esta região caracterizou-se climaticamente durante o ano de 1997/1998 com uma maior quantidade de chuva e temperaturas mais baixas que as demais regiões estudadas. Este dado está em conformidade com outros relatos (ABBAS et alii, 1988; NIJS et alii, 1996; PARK et alii, 1996; SHOTWELL & HESSELTINE, 1983), onde o clima frio e chuvoso é um dos principais fatores que favorecem o desenvolvimento de espécies de *Fusarium* spp. e consequentemente a produção de ZEA. Segundo JIMÉNEZ et alii (1996), MILANO & LOPEZ (1991), MONTANI et alii (1988) e SHERWOOD & PEBERDY (1974), a máxima produção de ZEA pelo *Fusarium graminearum* ocorre entre 12 a 20°C. Este dado coincide com a temperatura mínima média avaliada em Capão Bonito que foi de 18°C, enquanto em Ribeirão Preto e Votuporanga foi de 20 e 21°C, respectivamente. Portanto, dos ambientes estudados a região de Capão Bonito é a de maior risco para a produção de ZEA em milho. Apesar deste fato, apenas uma amostra apresentou-se contaminada. A baixa ocorrência de ZEA poderia estar relacionada com a flora fúngica. Segundo ALMEIDA (1996), o gênero *Fusarium* spp foi o que apresentou-se em maior quantidade em amostras de milho recém-colhido

no Estado de São Paulo, entretanto, as espécies predominantes foram o *F. moniliforme* (53,8%) seguido pelo *F. subglutinans* (7,7%).

No Brasil, SABINO et alii (1989) pesquisaram 358 amostras de milho provenientes das regiões Sul e Sudeste. As amostras provenientes do Paraná, Santa Catarina (Sul) e Espírito Santo (Sudeste) não apresentavam-se contaminadas com ZEA. Entretanto, aquelas do Estado do Rio Grande do Sul e Minas Gerais apresentaram 26,5% e 9,7%, respectivamente de contaminação por ZEA, os níveis de contaminação variaram de nd a 9830 µg/kg. Em outro estudo realizado no Rio Grande do Sul, HENNIGEN & DICK (1995) não detectaram ZEA nas 23 amostras de milho estocado em silos. SANTÚRIO et alii (1992), analisando 238 amostras de vários locais da região Sul, envolvidas na alimentação de suínos e aves, detectaram 4,8% das amostras contaminadas por ZEA com o nível máximo de 4982 µg/kg. No Brasil, a literatura não registra elevada frequência de ZEA em amostras de milho. Entretanto, o nível detectado, como o encontrado em nossa investigação (4640 µg/kg), reveste-se de grande importância, pois pode causar efeitos tóxicos em animais e no homem.

Os países de clima quente não têm apresentado problemas com contaminação de milho por ZEA, como: Brasil (HENNIGEN & DICK, 1995; SABINO et alii, 1989; SANTÚRIO et alii, 1992), Botswana (DOKO et alii, 1996; SIAME et alii, 1998), México (CARVAJAL & ARROYO, 1997), Índia (BHAVANISHANKAR & SHANTHA, 1987; SINHA, 1990); Moçambique, África do Sul, Malawi, Zâmbia, Zimbabwe, Quênia, Tanzânia, Uganda (DOKO et alii, 1996) e Coreia (RYU et alii, 1996). No entanto, os países de clima temperado e frio tem apresentado altos níveis e altas porcentagens de contaminação do milho por esta toxina. São eles: Argentina (TANAKA et alii, 1988; RESNIK et alii, 1996), Canadá (TANAKA et alii, 1988; SCOTT, 1997), Itália (TANAKA et alii, 1988), Hungria (KOUDELA et alii, 1990), Nova Zelândia (HUSSEIN et alii, 1989; LAUREN et alii, 1991) e Estados Unidos (ABBAS et alii, 1988; PARK et alii, 1996).

CONCLUSÕES

Os dados colhidos no presente trabalho mostram elevados teores de aflatoxinas no milho plantado em três regiões do Estado de São Paulo na safra 1997/1998. Os resultados demonstraram que 50% das amostras estavam contaminadas com níveis de aflatoxinas acima de 20 µg/kg. Apenas uma amostra apresentou-se contaminado com zearalenona e dois cultivares com a ocratoxina A, todos provenientes de Capão Bonito.

A avaliação dos fatores climatológicos com relação à produção de aflatoxinas nos cultivares de milho estudados demonstraram que a ausência de chuva e calor intenso na fase de florescimento e enchimento dos grãos favorece a contaminação destes por aflatoxinas.

Não foi observada interação entre a contaminação por aflatoxinas e tipo de cultivar, tipo de endosperma e ciclo vegetativo do milho.

Os resultados demonstraram que os locais, Votuporanga e Ribeirão Preto, favorecem a ocorrência de aflatoxinas em milho recém-colhido, portanto, os cultivares apresentaram diferente susceptibilidade a contaminação de aflatoxinas dependendo do local de plantio.

As diferenças nos níveis de aflatoxinas encontradas em amostras de alguns cultivares provenientes de diferentes locais de plantio, sugerem a possibilidade de pesquisas futuras para determinar a relação entre a contaminação por aflatoxinas e a resistência de cultivares em cada local de plantio durante as safras agrícolas anuais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ABARCA, M.L., BRAGULAT, M.R., CASTELLÁ, G., CABAÑES, F.J. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 7, p. 2650-2652, July 1994.
02. ABARCA, M.L., BRAGULAT, M.R., CASTELLÁ, G., ACCENSI, F., CABAÑES, F.J. New ochratoxigenic species in the genus *Aspergillus*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n.12, p. 1580-1582, 1997.
03. ABBAS, H.K., MIROCHA, C.J., MERONUCK, R.A., POKORNY, J.D., GOULD, S.L., KOMMEDAHL, T. Mycotoxins and *Fusarium* spp. associated with infected ears of corn in Minnesota. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 8, p. 1930-1933, Aug. 1988.
04. ABRAMSON, D. Development of molds, mycotoxins and odors in moist cereals during storage. In: CHELKOWSKI, J. ed. **Cereal grain: Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1991, pp. 119-148.
05. ABRAMSON, D., RICHTER, W., RINTELEN, J., SINHA, R.N., SCHUSTER, M. Ochratoxin A production in bavarian cereal grains stored at 15 and 19% moisture content. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 23, n. 2, p. 259-265, 1992.
06. ALMEIDA, A.P. **Microbiota fúngica e produção de aflatoxinas e fumonisinas, por cepas de *Aspergillus flavus* Link e *Fusarium moniliforme* Sheldon, de três híbridos de grãos de milho recém-colhido**. São Paulo, 1996. 120 ps. (Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
07. AOAC, ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, **Official Methods of Analysis**, 16th edition, Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists, Inc., Chapter 49, 1995.
08. BENNETT, G.A., ANDERSON, R.A. Distribution of aflatoxin and/or zearalenone in wet-milled corn products: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 26, n. 5, p. 1055-1060, 1978.
09. BHAVANISHANKAR, T.N., SHANTHA, T. Natural occurrence of *Fusarium* toxins in peanut, sorghum and maize from Mysore (India). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 40, n. 4, p. 327-332, 1987.
10. BORGEMEISTER, C., ADDA, C., SÉTAMOU, M., HELL, K., DJOMAMOU, B., MARKHAM, R.H., CARDWELL, K.F. Timing of harvest in maize: effects on post harvest losses due to insects and fungi in central Benin, with particular reference to

Prostephanus truncatus (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae). **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 233-242, 1998.

11. BRASIL. Leis, decretos, etc. Ministério da Agricultura. Portaria nº 183, de 21 de março de 1996. **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 de março de 1996. Art. 1. Adotar Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho, aprovado pela Resolução do Grupo Mercado Comum do Sul nº 56/94, de 01 de janeiro de 1995.
12. BROWN, R.L., COTTY, P.J., CLEVELAND, T.E., WIDSTROM, N.W. Living maize embryo influences accumulation of aflatoxin in maize kernels. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 56, n. 11, p. 967-971, Nov. 1993.
13. BRUNINI, O. - Probabilidade de cultivo do milho "safrinha" no Estado de São Paulo. **Anais do IV Seminário sobre a cultura do milho "safrinha"**, Assis, 1997. p. 37-55.
14. CARVAJAL, M., ARROYO, G. Management of aflatoxin contaminated maize en Tamaulipas, Mexico. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, n. 4, p. 1301-1305, 1997.
15. CASTEGNARO, M., BARSTCH H., CHERNOZEMSKY, I. Endemic nephropathy and urinary tract tumors in the Balkans. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 47, p. 3608-3609, 1987.
16. CHEN, I., MITCHELL, H.L. Trypsin inhibitors in plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 12, p. 327-330, 1973.
17. CHOUDHARY, A.K. Influence of microbial co-inhabitants on aflatoxin synthesis of *Aspergillus flavus* on maize kernels. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 14, p. 143-147, 1992.
18. DIENER, U.L., DAVIS, N.D. Biology of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. In: ZUBER, M.S., LILLEHOJ, E.B., RENFRO, B.L. (eds.), **Aflatoxin in Maize: A proceedings of the workshop**. Mexico: CIMMYT, 1987, pp. 33-40.
19. DOKO, M.B., CANET, C., BROWN, N., SYDENHAM, E.W., MPUCHANE, S., SIAME, B.A. Natural co-occurrence of fumonisins and zearalenone in cereals and cereal-based foods from Eastern and Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 10, p. 3240-3243, 1996.
20. DUARTE, A.D., PATERNIANI, M.E.A.G.Z. Cultivares de milho no Estado de São Paulo. **Documentos IAC**, Campinas, n.62, 1998. 81 p.
21. GOLINSKI, P., GRABARKIEWICZ-SZCZESNA, J. Chemical confirmatory tests for ochratoxin A, citrinin, penicillic acid, sterigmatocystin, and zearalenone performed

directly on thin layer chromatographic plates. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 67, n. 6, p. 1108-1110, 1984.

22. GORMAN, D.P., KANG, M.S. Preharvest aflatoxin contamination in maize: resistance and genetics. **Plant Breeding**, Berlin, v. 107, n. 1, p. 1-10, 1991.
23. GORMAN, D.P., KANG, M.S., CLEVELAND, T., HUTCHINSON, R.L. Field aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on maize kernels. **Euphytica**, Dordrecht, v. 61, n. 3, p. 187-191, 1992.
24. GUO, B.Z., BROWN, R.L., LAX, A.R., CLEVELAND, T.E., RUSSIN, J.S., WIDSTROM, N.W. Protein profiles and antifungal activities of kernel extracts from corn genotypes resistant and susceptible to *Aspergillus flavus*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 1, p. 98-102, 1998.
25. GUO, B.Z., RUSSIN, J.S., CLEVELAND, T.E., BROWN, R.L., DAMANN, K.E. Evidence for cutinase production by *Aspergillus flavus* and its possible role in infection of corn kernels. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, n. 8, p. 824-829, 1996.
26. HAMMERSCHMIDT, R., NICHOLSON, R.L. Resistance of maize to anthracnose: changes in host phenols and pigments. **Phytopathology**, St. Paul, v. 67, p. 251-258, 1977.
27. HELL, K., UDOH, J., SÉTAMOU, M., CARDWELL, K.F., VISCONTI, A. Fungal infection and mycotoxins in maize in the different agroecological zones of Benin and Nigeria. In: CARDWELL, K.F. ed., **Workshop on Mycotoxins in Food in Africa**. Cotonou: International Institute of Tropical Agriculture, 1996, 31 p.
28. HENNIGEN, M.R., DICK, T. Incidence and abundance of mycotoxins in maize in Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 12, n. 5, p. 677-681, 1995.
29. HUANG, Z., WHITE, D.G., PAYNE, G.A. Corn seed proteins inhibitory to *Aspergillus flavus* and aflatoxin biosynthesis. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 6, p. 622-627, 1997.
30. HUNT, D.C., McCONNIE, B.R., CROSBY, N.T. Confirmation of ochratoxin A by chemical derivatisation and high-performance liquid chromatography. **Analyst**, London, v. 105, p. 89-91, Jan. 1980.
31. HUSSEIN, H.M., FRANICH, R.A., BAXTER, M., ANDREW, I.G. Naturally occurring *Fusarium* toxins in New Zealand maize. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 6, n. 1, p. 49-58, 1989.
32. JIMÉNEZ, M., MÁÑEZ, M., HERNÁNDEZ, E. Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 29, p. 417-421, 1996.

33. JONES, R.K., DUNCAN, H.E., PAYNE, G.A., LENARD, K.J. Factors influencing infection by *Aspergillus flavus* in silk-inoculated corn. **Plant Disease**, St. Paul, v. 64, p. 859-863, 1980.
34. KARUNARATNE, A., WEZENBERG, E., BULLERMAN, L.B. Inhibition of mold growth and aflatoxin production by *Lactobacillus spp.* **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 53, n. 3, p. 230-236, 1990.
35. KLUN, J.A., GUTHRIE, W.D., HALLAUER, A.R., RUSSELL, W.A. Genetic nature of the concentration of 2,4-dihydroxy-7-methoxy 2H-1,4-benzoxazine-3(4H)-one and resistance to the European corn borer in a diallel set of eleven maize inbreds. **Crop Science**, Madison, v. 10, p. 87-90, 1970.
36. KOUDELA, S., SOÓS, K., SOHÁR, J., BÍRÓ, G. The assessment of zearalenone exposition of the hungarian population in connection with *Fusarium* infected cereals. **Acta Alimentaria**, Budapest, v. 19, n. 3, p. 229-235, 1990.
37. KUIPER-GOODMAN, T., SCOTT, P.M., WATANABE, H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Orlando, v. 7, n. 3, p. 253-306, 1987.
38. LAI, M., SEMENIUK, G., HESSELTINE, C.W. Conditions for production of ochratoxin A by *Aspergillus* species in a synthetic medium. **Applied Microbiology**, Washington, v. 19, p. 542-544, 1970.
39. LAUREN, D.R., AGNEW, M.P., SMITH, W.A., SAYER, S.T. A survey of the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in cereals grown in New Zealand in 1986-1989. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 8, n. 5, p. 599-605, 1991.
40. LILLEHOJ, E.B., ELLING, F. Environmental conditions that facilitate ochratoxin contamination of agricultural commodities. **Acta Agriculturae Scandinavica**, Stockholm, v. 33, p. 113-127, 1983.
41. LILLEHOJ, E.B., KWOLEK, W.F., HORNER, E.S., WIDSTROM, N.W., JOSEPHSON, L.M., FRANZ, A.O., CATALANO, E.A. Aflatoxin contamination of preharvest corn: role of *Aspergillus flavus* inoculum and insect damage. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 57, n. 4, p. 255-257, 1980a.
42. LILLEHOJ, E.B., KWOLEK, W.F., ZUBER, M.S., BOCKHOLT, A.J., CALVERT, O.H., FINDLEY, W.R., GUTHRIE, W.D., HORNER, E.S., JOSEPHSON, L.M., KING, S., MANWILLER, A., SAUER, D.B., THOMPSON, D., TURNER, M., WIDSTROM, N.W. Aflatoxin in corn before harvest: interaction of hybrids and locations. **Crop Science**, Madison, v. 20, p. 731-734, Nov-Dec. 1980b.

43. LILLEHOJ, E.B., KWOLEK, W.F., VANDERGRAFT, E.E., ZUBER, M.S., CALVERT, O.H., WIDSTROM, N.W., FUTRELL, M.C., BOCKHOLT, A.J. Aflatoxin production in *Aspergillus flavus* inoculated ears of corn grown at diverse locations. **Crop Science**, Madison, v. 15, p. 267-270, Mar-Apr. 1975.
44. McMILLIAN, W.W., WIDSTROM, N.W., WILSON, D.M. Aflatoxin production on various popcorn genotypes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 74, p. 156-157, Jan-Feb. 1982.
45. MILANEZ, T.V., ATUI, M.B., LÁZZARI, F.A. Comparação entre imunoensaio e cromatografia em camada delgada na determinação de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em amostras de milho em grão e fubá. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 57, n. 1, p. 65-71, 1998.
46. MILANO, G.D., LOPEZ, T.A. Influence of temperature on zearalenone production by regional strains of *Fusarium graminearum* and *Fusarium oxysporum* in culture. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 13, p. 329-334, 1991.
47. MIROCHA, C.J., CHRISTENSEN, C.M. Oestrogenic mycotoxins synthesized by *Fusarium*. In: PURCHASE, J.F.H. ed.. **Mycotoxins**, Amsterdam: Elsevier, 1974. pp. 129-149.
48. MONTANI, M.L., VAAMONDE, G., RESNIK, S.L., BUERA, P. Influence of water activity and temperature on the accumulation of zearalenone in corn. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 6, n. 1, p. 1-8, 1988.
49. NIJS, M., SOENTORO, P., ASCH, E.D., KAMPHUIS, H., ROMBOUTS, F.M., NOTERMANS, S.H.W. Fungal infection and presence of deoxynivalenol and zearalenone in cereals grown in the Netherlands. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 7, p. 772-777, 1996.
50. PARK, J.J., SMALLEY, E.B., CHU, F.S. Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in field samples from the 1992 Wisconsin corn crop. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 5, p. 1642-1648, May 1996.
51. PAYNE, G.A., CASSEL, D.K., ADKINS, C.R. Reduction of aflatoxin contamination in corn by irrigation and tillage. **Phytopathology**, St. Paul, v. 76, p. 679-684, 1986.
52. PAYNE, G.A., THOMPSON, D.L., LILLEHOJ, E.B., ZUBER, M.S., ADKINS, C.R. Effect of temperature on the preharvest infection of maize kernels by *Aspergillus flavus*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 10, p. 1376-1380, 1988.
53. PRELUSKY, D.B., ROTTER, B.A., ROTTER, R.G. Toxicology of mycotoxins. In: MILLER, J.D., TRENHOLM, H. (eds.). **Mycotoxins in Grain**, St. Paul: Eagan Press, 1994. pp. 329-358.

54. PRZYBYLSKI, W. Formation of aflatoxin derivatives on thin layer chromatographic plates. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 58, n. 1, p. 163-164, 1975.
55. RAMAKRISHNA, Y., BHAT, R.V., VASANTHI, S. Natural occurrence of mycotoxins in staple foods in India. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 9, p. 1857-1859, 1990.
56. RESNIK, S., NEIRA, S., PACIN, A., MARTINEZ, E., APRO, N., LATREITE, S. A survey of the natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in Argentine field maize: 1983-1994. **Foods Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 1, p. 115-120, 1996.
57. RICHARD, J.L., BENNETT, G.A., ROSS, P.F., NELSON, P.E. Analysis of naturally occurring mycotoxins in feedstuffs and food. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 71, p. 2563-2574, 1993.
58. RYU, J.C., YANG, J.S., SONG, Y.S., KWON, O.S., PARK, J., CHANG, I.M. Survey of natural occurrence of trichothecene mycotoxins and zearalenone in Korean cereals harvested in 1992 using gas chromatography/mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 3, p. 333-341, 1996.
59. SABINO, M., PRADO, G., INOMATA, E.I., PEDROSO, M.O., GARCIA, R.V. Natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in maize in Brazil. Part II. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 6, n.3, p. 327-331, 1989.
60. SANTÚRIO, J.M., BALDISSERA, M.A., ALMEIDA, C.A.A., AHMAD, S.H.C., PRANKE, P.H.L., HEINRICHS, C.M., ZANANDREA, S. Aflatoxins, ocratoxina A e zearalenona em grãos e rações destinados aos consumo animal no Sul do Brasil. **Anais do VII Encontro Nacional de Micotoxinas**, São Paulo, 1992, p. 14.
61. SCHMITT, S.G., HURBURGH Jr., C.R. Distribution and measurement of aflatoxin in 1983 Iowa corn. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 66, n. 3, p. 165-168, 1989.
62. SCOTT, G.E., ZUMMO, N. Preharvest kernel infection by *Aspergillus flavus* for resistant and susceptible maize hybrids. **Crop Science**, Madison, v. 30, p. 381-383, Mar-Apr. 1990.
63. SCOTT, G.E., ZUMMO, N. Sources of resistance in maize to kernel infection by *Aspergillus flavus* in the field. **Crop Science**, Madison, v. 28, p. 504-507, May-Jun. 1988.
64. SCOTT, P.M. Multi-year monitoring of canadian grains and grain-based foods for trichothecenes and zearalenone. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 14, n. 4, p. 333-339, 1997.

65. SCOTT, P.M., LAWRENCE, J.W., van WALBEEK, W. Detection of mycotoxins by thin-layer chromatography: application to screening of fungal extracts. **Applied Microbiology**, Washington, v. 20, p. 839-842, 1970.
66. SHERWOOD, R.F., PEBERDY, J.F. Production of the mycotoxin, zearalenone, by *Fusarium graminearum* growing on stored grain. I. Grain storage at reduced temperatures. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Chichester, v. 25, p. 1081-1087, 1974.
67. SHOTWELL, O.L., HESSELTINE, C.W. Five-year study of Mycotoxins in Virginia wheat and dent corn. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 66, n. 6, p. 1466-1469, 1983.
68. SHOTWELL, O.L., HESSELTINE, C.W., GOULDEN, M.L. Ochratoxin A: occurrence as natural contaminant of a corn sample. **Applied Microbiology**, Washington, v. 17, n. 5, p. 765-766, May 1969.
69. SHOTWELL, O.L., HESSELTINE, C.W., GOULDEN, M.L., VANDEGRAFT, E.E. Survey of corn for aflatoxin, zearalenone, and ochratoxin. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 47, p. 700-707, Nov. 1970.
70. SIAME, B.A., MPUCHANE, S.F., GASHE, B.A., ALLOTEY, J., TEFFERA, G. Occurrence of aflatoxins, fumonisin B₁, and zearalenone in foods and feeds in Botswana. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 12, p. 1670-1673, 1998.
71. SINHA, K.K. Incidence of mycotoxins in maize grains in Bihar State, India. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 7, n. 1, p. 55-61, 1990.
72. SOARES, L.M.V., RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 72, n. 1, p. 22-26, 1989.
73. TANAKA, T., HASEGAWA, A., YAMAMOTO, S., LEE, U.S., SUGIURA, Y., UENO, Y. Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 36, n. 5, p. 979-983, 1988.
74. THOMPSON, D.L., LILLEHOJ, E.B., LEONARD, K.J., KWOLEK, W.F., ZUBER, M.S. Aflatoxin concentration in corn as influenced by kernel development stage and postinoculation temperature in controlled environments. **Crop Science**, Madison, v. 20, p. 609-612, 1980.
75. VIQUEZ, O.M., CASTELL-PEREZ, M.E., SHELBY, R.A., BROWN, G. Aflatoxin contamination in corn samples due to environmental conditions, aflatoxin-producing

- strains, and nutrients in grain grown in Costa Rica. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, n. 11, p. 2551-2555, 1994.
76. WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mycotoxins**, Geneva: UNEP/WHO, 1979. 127p. (Environmental Health Criteria 11).
77. ZERINGUE Jr., H.J. Volatile antifungal compounds in maize kernels: effect of ear position on aflatoxin production. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, v. 80, n. 2, p. 341-344, 1997.
78. ZUBER, M.S., DARRAH, L.L., LILLEHOJ, E.B., JOSEPHSON, L.M., MANWILLER, A., SCOTT, G.E., GUDAUSKAS, R.T., HORNER, E.S., WIDSTRON, N.W., THOMPSON, D.L., BOCKHOLT, A.J., BREWBAKER, J.L. Comparison of open-pollinated maize varieties and hybrids for preharvest aflatoxin contamination in the Southern United States. **Plant Disease**, St. Paul, v. 67, n. 2, p. 185-187, Feb. 1983.
79. ZUBER, M.S., LILLEHOJ, E.B. Status of the aflatoxin problem in corn. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 8, n. 1, p. 1-5, Jan-Mar. 1979.
80. ZUMMO, N., SCOTT, G.E. Interaction of *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus flavus* on Kernel infection and aflatoxin contamination in maize ears. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, p. 771-773, 1992.

Capítulo 5

OCORRÊNCIA DE FUMONISINAS B₁ E B₂ EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS À BASE DE MILHO NO MERCADO BRASILEIRO

OCORRÊNCIA DE FUMONISINAS B₁ E B₂ EM PRODUTOS ALIMENTÍCIOS À BASE DE MILHO NO MERCADO BRASILEIRO

RESUMO

A ocorrência de fumonisinas B₁ (FB₁) e B₂ (FB₂) foi avaliada em 81 amostras de alimentos à base de milho, que foram obtidas no comércio da cidade de Campinas, SP, Brasil, entre os meses de Março a Maio de 1999. O método de SHEPHARD et alii (1990) com modificações foi empregado para a determinação de FB₁ e FB₂. A média das recuperações e os limites de detecção foram 80% e 0,020 µg/g e 73% e 0,020 µg/g para FB₁ e FB₂, respectivamente. Quarenta amostras (49%) foram positivas para FB₁ (0,03 a 4,93 µg/g) e quarenta e quatro amostras (54%) para FB₂ (0,02 a 1,38 µg/g). A maior frequência de amostras positivas e também a mais alta concentração de FB₁ foi encontrada nas amostras de fubá (100%, 4,93 µg/g). Os alimentos encontrados com níveis de FB₁+FB₂ acima de 1 µg/g foram: fubá (88,9%), farinha de milho pré-cozida (50%), canjiquinha (50%), farinha de milho (36,4%), canjica (27,3%) e pipoca (11,1%). Os níveis médios mais baixos de contaminação por FB₁ e FB₂, respectivamente, foram apresentados pelos seguintes alimentos: pipoca (0,35 e 0,07 µg/g), farinha de milho infantil (0,22 e 0,02 µg/g), "corn flakes" (0,16 e 0,01 µg/g) e milho em conserva (0,01 e 0,08 µg/g). As amostras de milho verde, pamonha e curau não apresentaram contaminação detectável. Os dados demonstraram a ocorrência natural de fumonisinas em produtos à base de milho no Brasil. Estes resultados indicam que há um risco à saúde pela exposição às fumonisinas através do consumo de alguns alimentos à base de milho.

Unitermos: Fumonisina B₁, Fumonisina B₂, Produtos à base de milho.

INTRODUÇÃO

As fumonisinas são um grupo de micotoxinas produzidas principalmente pelo *Fusarium moniliforme* (GELDERBLOM et alii, 1988) e *F. proliferatum* (NELSON et alii, 1992), frequentemente isolados do milho. Porém, outras espécies do gênero *Fusarium* também são produtoras de fumonisinas: *F. anthophilum*, *F. dlamini*, *F. napiforme*, *F. nygamai* (NELSON et alii, 1992), *F. subglutinans* (DOKO & VISCONTI, 1994), *F. oxysporum* var. *redolens* (ABBAS et alii, 1995) e *F. polyphialidicum* (ABBAS & OCAMB, 1995). A *Alternaria alternata* f. sp. *lycorpersici* (CHEN et alii, 1992), isolada de tomates, também produziu fumonisina B₁ (FB₁) em condições de laboratório. Desde o isolamento e caracterização destas micotoxinas por GELDERBLOM et alii (1988) e BEZUIDENHOUT et alii (1988), as fumonisinas têm interessado aos micotoxicologistas quanto aos seus efeitos tóxicos e sua ampla ocorrência em milho e alimentos à base de milho (CASTELO et alii, 1998a; DOKO & VISCONTI, 1994; HOPMANS & MURPHY, 1993; PATEL et alii, 1997; PITTET et alii, 1992; SANCHIS et alii, 1994; SYDENHAM et alii, 1991).

Quimicamente, as fumonisinas possuem uma cadeia de 19 a 20 átomos aminopolihidroalquil, a qual é diesterificada com o ácido propano-1,2,3-tricarboxílico. Das várias fumonisinas identificadas (A₁, A₂, A₃, AK₁, B₁, B₂, B₃, B₄, C₁, C₃, C₄, P₁, P₂, P₃, PH_{1a}, PH_{1b}) (BEZUIDENHOUT et alii, 1988; CAWOOD et alii, 1991; MUSSER & PLATTNER, 1997; SEO & LEE, 1999), a FB₁ é considerada a mais abundante e mais tóxica (CAWOOD et alii, 1991).

Estudos têm demonstrado que as fumonisinas causam várias doenças em animais: a leucoencefalomalácia em eqüinos (KELLERMAN et alii, 1990; ROSS et alii, 1992), edema pulmonar e hidrotórax em suínos (COLVIN & HARRISON, 1992; HARRISON et alii, 1990), hemorragia cerebral em coelhos (BUCCI et alii, 1996) e câncer hepático em ratos (GELDERBLOM et alii, 1991). As fumonisinas têm sido associadas com câncer de esôfago na região de Transkei na África do Sul (RHEEDER et alii, 1992), na região de Lixian na China

(CHU & LI, 1994), Nordeste da Itália (DOKO & VISCONTI, 1994) e em Charleston, Sudeste dos Estados Unidos (SYDENHAM et alii, 1991). Nestas regiões o milho é importante na dieta da população, e os dados preliminares indicam que o milho destes locais tem apresentado uma quantia significativa de contaminação por fumonisinas. Com base nas informações toxicológicas disponíveis, a *Agência Internacional sobre Pesquisa do Câncer* (IARC) classificou as toxinas do *F. moniliforme*, incluindo as fumonisinas, como classe 2B, isto é, possivelmente carcinogênicas para o homem (IARC, 1993).

Os dados sobre a toxicidade da FB₁ e a ampla ocorrência natural desta micotoxina em alimentos, indicam que esta toxina possui um potencial de risco para a saúde humana. Para avaliar este risco ao qual os consumidores estão expostos, faz-se necessário obter dados sobre a distribuição e os níveis de contaminação desta micotoxina nos alimentos disponíveis ao consumo humano. Vários métodos analíticos têm sido desenvolvidos para este propósito, tais como: cromatografia líquida de alta eficiência (RICE et alii, 1995; SHEPHARD et alii, 1990; SYDENHAM et alii, 1992b), cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PLATTNER et alii, 1990), cromatografia em camada delgada (ROTTINGHAUS et alii, 1992; SYDENHAM et alii, 1990) e ensaios imunoenzimáticos (CHU, 1996).

No Brasil, alguns trabalhos relatam a existência de fumonisinas em milho (CAMARGOS et alii, 1998; HIROOKA et alii, 1996; MACHINSKI Jr. et alii, 1998; ONO, 1999; ORSI et alii, 2000; SYDENHAM et alii, 1992a). Isto indica que os produtos à base de milho oferecidos ao consumo humano podem estar contaminados com estas micotoxinas. Além disto, PETSKA et alii (1994) e SYDENHAM et alii (1991) demonstraram que produtos de milho sem processamento ou com processamentos térmicos leves têm apresentado altos níveis de FB₁. BENNETT et alii (1996), KATTA et alii (1999) e SYDENHAM et alii (1994) demonstraram que dependendo do processamento do milho ocorre uma redução de 26 a 95% na contaminação por FB₁ no produto final.

Este trabalho teve como objetivo investigar os níveis de FB₁ e FB₂ em produtos alimentícios à base de milho oferecidos em mercados da cidade de Campinas, Estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Entre Março e Maio de 1999 foram adquiridos oitenta e um produtos alimentícios à base de milho em mercados da cidade de Campinas, Brasil. Foram coletadas as seguintes amostras: onze de milho para canjica (também em outros Estados chamado de milho para mungunzá, preparado à base de milho seco cozido que pode conter leite, açúcar e especiarias), duas de canjiquinha (milho grosseiramente quebrado, também chamado de quirera em outros Estados), quatro de “corn flakes”, duas de curau (alimento à base de milho verde moído que pode conter leite, leite de coco e especiarias, também chamado de canjica em outros Estados), onze de farinha de milho, duas de farinha de milho destinado à população infantil, seis de farinha de milho pré-cozida, nove de fubá, sete de milho verde, onze de milho em conserva, sete de pamonha (alimento à base de milho verde cozido em bolsas feitas com a palha) e nove de pipoca.

O tamanho mínimo da amostra foi de 500 g. As amostras foram moídas ou homogeneizadas e estocadas a -18°C antes da análise. A distribuição das amostras é dada na Tabela 23.

Determinação de Fumonisinias B₁ e B₂

Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Todos os solventes usados em cromatografia líquida de alta eficiência foram de grau cromatográfico. O padrão de FB₁ foi obtido da CSIR Food Science and Technology (Pretoria - África do Sul) e de FB₂ da Sigma Chemical Company (Estados Unidos). As soluções estoque individuais de FB₁ e FB₂ foram preparadas pesando-se 0,001 g do padrão e dissolvendo-se em 10 mL de acetonitrila-água (1:1-v/v), respectivamente, obtendo-se uma concentração de 100 µg/mL. As soluções de trabalho foram de 25 e 50 µg/mL de FB₁+FB₂. Todas as soluções de padrões foram armazenadas em frascos âmbar vedados, sob temperatura de -18°C (VISCONTI et alii, 1994).

Extração, limpeza e determinação de fumonisinas B₁ e B₂

A determinação de FB₁ e FB₂ foi realizada segundo o método descrito por SHEPHARD et alii (1990), com as modificações, sugeridas por CAMARGOS et alii (no prelo). Cinquenta gramas da amostra foram homogeneizadas em liquidificador com 100 mL de metanol-água (3:1-v/v) durante 5 minutos. Ao invés de 100 mL foram usados 200 mL de metanol-água (3:1-v/v) nas amostras de farinha de milho destinadas à população infantil. A mistura foi centrifugada durante 10 minutos a 2500 rpm e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro. O filtrado teve o pH corrigido, quando necessário, para um pH entre 5,8-6,5 com hidróxido de sódio 1 N ou ácido clorídrico 1 N. A limpeza foi realizada por extração em fase sólida com coluna de troca aniônica forte (SAX - Varian®). O condicionamento da coluna foi feito através de lavagens sucessivas com 10 mL de metanol seguidos por 10 mL de metanol-água (3:1-v/v).

Foram aplicados 10 mL do extrato filtrado na coluna e lavados com 10 mL de metanol-água (3:1-v/v), seguidos por 6 mL de metanol. As fumonisinas B₁ e B₂ foram eluídas

com 20 mL de metanol-ácido acético glacial (95:5-v/v). O eluato foi evaporado sob fluxo de nitrogênio em banho-maria a 60°C.

A determinação de fumonisinas foi realizada mediante a derivação com o-ftaldialdeído (OPA), onde os extratos das amostras de milho foram redissolvidos em 500 µL de acetonitrila-água (1:1-v/v). Foram transferidos 100 µL deste extrato para um frasco e adicionados 200 µL do reagente OPA (dissolver 40 mg de OPA em 1 mL de metanol, diluir com 5 mL de tampão tetraborato de sódio 0,1 M pH 10,4 e adicionar 50 µL de 2-mercaptoetanol). Foi agitado em ultra-som a 5-15°C durante 30 segundos, e injetados após 60 segundos de reação no cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE), consistindo de uma bomba M-510 (Waters Associates, Millford, MA) com alça de injeção de 20 µL e um injetor tipo Rheodyne Inc. M-7125 (Cotati, CA) conectado a um detector de fluorescência HP 1046A com comprimento de onda de excitação de 335 nm e de emissão de 440 nm, e um integrador HP 3393A (Hewlett Packard, Avondale, PA). As separações foram feitas em coluna (250 mm x 4,6 mm) Varian® (Walnut Creek, CA) empacotada com Microsorb-MV 5 µm ODS de fase reversa, usando uma fase móvel composta por acetonitrila-água-ácido acético glacial (47:53:0,5-v/v/v) até 15 minutos, seguida por acetonitrila pura até o final da corrida (30 minutos). A quantificação foi feita comparando-se as áreas dos picos com as áreas obtidas com a solução de trabalho (25 ou 50 µg/mL).

A identificação dos compostos analisados foi realizada através da comparação dos tempos de retenção estabelecidos com as amostras e os padrões. Os limites de detecção do método foram definidos como a concentração das FB₁ e FB₂ presentes na amostra que originou a menor área que permitia visualização inequívoca do pico. O limite de detecção para FB₁ e FB₂ foi de 0,020 µg/g, para ambas micotoxinas.

Controle de qualidade analítica

Todas as amostras foram analisadas em duplicata. As duplicatas foram analisadas em dias diferentes. Cada conjunto de 9 amostras foi acompanhado com uma amostra enriquecida artificialmente, isto é, para as amostras extraídas no mesmo dia uma quantidade de toxina (1 ou 2 $\mu\text{g/g}$ de FB_1 e FB_2) foi adicionada em uma amostra conhecida no dia anterior a extração. Estas amostras foram usadas para avaliar a recuperação e para a quantificação, assim todos os resultados foram corrigidos pela recuperação encontrada. Os seguintes critérios de qualidade analítica foram definidos: a recuperação deveria estar entre 58-110% e o coeficiente de variação entre as duplicatas inferior a 30%.

Regeneração das colunas de troca aniônica

A regeneração das colunas de troca aniônica forte foi realizada com 5 mL de ácido clorídrico 0,1 N seguidos por 8 mL de água destilada, segundo SYDENHAM et alii (1992b).

Descontaminação do material

Todo o material utilizado foi descontaminado com uma solução concentrada de hipoclorito de sódio comercial, por 24 horas. Após a descontaminação o material foi lavado normalmente, enxaguado com água destilada e seco à temperatura ambiente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Controle de qualidade analítico

As curvas padrão para FB_1 e FB_2 foram lineares de 20 a 10000 ng/g. A recuperação do método modificado foi de 60 a 110% (média de 80%) para FB_1 e de 58 a 102% (média de 73%) para FB_2 , conforme a Tabela 22.

Tabela 22 - Recuperação de amostras de produtos de milho enriquecida com FB_1 e FB_2 como controle nas análises dos produtos alimentícios à base de milho adquiridas no comércio de Campinas, Março a Maio de 1999.

Amostras	Recuperação (%)		coluna de troca aniônica forte
	FB_1	FB_2	
1. Canjica	74	58	nova
	71	66	nova
	60	58	regenerada
2. "Corn flakes"	90	100	nova
	80	81	regenerada
3. Farinha de milho	110	90	nova
	60	58	regenerada
4. Fubá	72	93	nova
	99	78	regenerada
	110	102	nova
5. Milho verde	60	58	nova
6. Milho verde em conserva	86	58	nova
	78	68	regenerada
7. Pamonha	67	59	nova
Média	80	73	

Ocorrência de fumonisinas

Oitenta e um produtos alimentícios à base de milho; incluindo: canjica, canjiquinha, “corn flakes”, curau, farinha de milho, farinha de milho destinado à população infantil, farinha de milho pré-cozida, fubá, milho verde em conserva, pamonha e pipoca, foram coletados de mercados da cidade de Campinas (Brasil), e foram analisados para FB₁ e FB₂ por cromatografia a líquido de alta eficiência. Estas amostras representam os produtos alimentícios comercializados nesta região, mas não necessariamente representam o milho colhido e processado nesta área e com isso, não necessariamente refletem a ocorrência regional de fumonisinas.

As fumonisinas foram detectadas em 54% (44/81) de todos os alimentos analisados, em uma concentração total (FB₁+FB₂) variando de 0,08 a 6,31 µg/g. Os resultados deste levantamento estão resumidos na Tabela 23. Entre as amostras positivas, 40 (49%) apresentaram a FB₁ em concentração variando de 0,06 a 4,93 µg/g, e 44 (54%) continham FB₂ em concentração entre 0,03 a 1,38 µg/g. A concentração média de FB₁ e FB₂ nas 81 amostras analisadas foi de 0,58 e 0,16 µg/g, respectivamente. Como esperado, a FB₁ apresentou-se em quantidades três vezes superior a FB₂. Este dado confirma o levantamento realizado por SHEPHARD et alii (1996).

A mais alta frequência de amostras positivas e também a mais alta concentração de FB₁ e FB₂ foram encontradas em fubá (100%, 4,93 µg/g para FB₁, 1,38 µg/g para FB₂). Variando de 0,56 a 4,93 µg/g para FB₁ e de 0,21 a 1,38 µg/g para FB₂. A concentração média de FB₁ e FB₂ foi de 2,29 e 0,60 µg/g, respectivamente. A concentração média de fumonisinas encontrada foi equivalente à encontrada por CASTELO et alii (1998a) nos Estados Unidos, DOKO & VISCONTI (1994) na Itália e por SYDENHAM et alii (1991) no Egito, mas superior a encontrada por PATEL et alii (1997), PIÑEIRO et alii (1997), PITTET et alii (1992), STACK & EPPLEY (1992) e SYDENHAM et alii (1991) em outros países, conforme demonstra a Tabela 24.

Tabela 23 - Teores de fumonisinas B₁ e B₂ encontrados em produtos alimentícios à base de milho adquiridos no comércio de Campinas, Março a Maio de 1999.

Produtos alimentícios	Incidência (n° positivos/ total)	Fumonisina B ₁				Fumonisina B ₂				FB ₁ +FB ₂ Média total	
		Variação (µg/g)	Média, positivas	Média, total	Mediana, total	Variação (µg/g)	Média, positivas	Média, total	Mediana, total		
	FB ₁	FB ₂									
canjica	8/11	8/11	nd-4,52	1,16	0,84	0,14	nd-0,64	0,21	0,15	0,03	0,99
canjiquinha	2/2	2/2	0,17-1,23	0,70	0,70	0,70	0,05-0,30	0,18	0,18	0,18	0,88
“corn flakes”	1/4	1/4	nd-0,66	0,66	0,17	nd	nd-0,03	0,03	0,008	nd	0,18
curau	0/2	0/2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
farinha de milho	9/11	9/11	nd-1,46	0,74	0,61	0,66	nd-0,51	0,27	0,22	0,21	0,83
farinha de milho dest. à pop. infantil	1/2	1/2	nd-0,44	0,44	0,22	0,22	nd-0,05	0,05	0,03	0,03	0,25
farinha de milho pré-cozida	4/6	4/6	nd-1,79	1,26	0,84	0,86	nd-0,42	0,31	0,20	0,20	1,04
fubá	9/9	9/9	0,56-4,93	2,29	2,29	2,32	0,21-1,38	0,60	0,60	0,52	2,89
milho verde	0/7	0/7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
milho verde em conserva	2/11	6/11	nd-0,08	0,07	0,01	nd	nd-0,21	0,15	0,08	0,08	0,09
pamonha	0/7	0/7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
pipoca	4/9	4/9	nd-1,72	0,75	0,33	nd	nd-0,30	0,18	0,08	nd	0,41
TOTAL	40/81	44/81	nd-4,93	1,18	0,58	nd	nd-1,38	0,29	0,16	0,03	0,74

nd - não detectado. Limite de detecção para FB₁ e FB₂ foi de 0,02 µg/g.

Tabela 24 - Ocorrência de fumonisinas B₁ e B₂ em fubá.

Ano	País	Incidência (nº pos./total)		Concentração média (µg/g)		Referência bibliográfica
		FB ₁	FB ₂	FB ₁	FB ₂	
1989/90	Estados Unidos	6/6	6/6	0,57	0,17	HOPMANS & MURPHY, 1993
1990/91	África do Sul	46/52	11/52	0,14 ^a	0,08 ^a	SYDENHAM et alii, 1991
1990/91	Canadá	1/2	0/2	0,03	nd	SYDENHAM et alii, 1991
1990/91	Egito	2/2	2/2	2,38	0,59	SYDENHAM et alii, 1991
1990/91	Estados Unidos	15/16	13/16	1,05 ^a	0,29 ^a	SYDENHAM et alii, 1991
1990/91	Peru	1/2	1/2	0,33	0,07	SYDENHAM et alii, 1991
1990/91	Estados Unidos	12/12	12/12	0,94	0,24	STACK & EPPLEY, 1992
1991	Suiça	2/7	0/7	0,09 ^a	nd	PITTET et alii, 1992
1992/93	Itália	7/7	7/7	2,35	0,53	DOKO & VISCONTI, 1994
1994/95	Reino Unido	16/20	b	0,53	b	PATEL et alii, 1997
1995/96	Uruguai	3/8	0/2	0,10	nd/b	PIÑEIRO et alii, 1997
1998	Estados Unidos	8/10	b	1,13	b	CASTELO et alii, 1998a

nd - não detectado

a - concentração média das amostras positivas.

b - não determinado.

Níveis elevados de fumonisinas foram observados em alimentos, como: canjica, canjiquinha, farinha de milho e farinha de milho pré-cozida. Vinte e três destas amostras (76,7%) foram positivas para FB₁ e FB₂, com concentração variando de nd a 4,52 e de nd a 0,64 µg/g, respectivamente. Baixos níveis de contaminação foram relatados em amostras de “corn flakes”, farinha de milho destinado à população infantil, milho verde em conserva e pipoca.

Nas amostras de milho verde e alimentos típicos “curau” e “pamonha”, ambos preparados com milho verde, não foi detectada nenhuma contaminação por fumonisinas. Este fato pode estar relacionado com a colheita deste milho que acontece antes de completar a fase de maturação. Segundo CHULZE et alii (1996) a maior produção de fumonisinas ocorre nas fases intermediária e tardia da maturação da espiga.

A figura 25 demonstra que a ocorrência de fumonisinas em produtos alimentícios à base de milho é mais elevada nos alimentos que sofreram as formas mínimas ou suaves de processamento, como: fubá, canjica, canjiquinha e farinha de milho, onde ocorre apenas uma

moagem física ou processo de trituração. Produtos como o “corn flakes” que são altamente processados apresentaram contaminação por fumonisinas muito baixa. Milho verde em conserva também apresentou baixos níveis de fumonisinas. Estes dados são compatíveis com os encontrados por CASTELO et alii (1998a). DOKO & VISCONTI (1994), PATEL et alii (1997), PIÑEIRO et alii (1997), PITTET et alii (1992), SANCHIS et alii (1994), STACK & EPPLEY (1992), SYDENHAM et alii (1991), TRUCKSESS et alii (1995) e UENO et alii (1993).

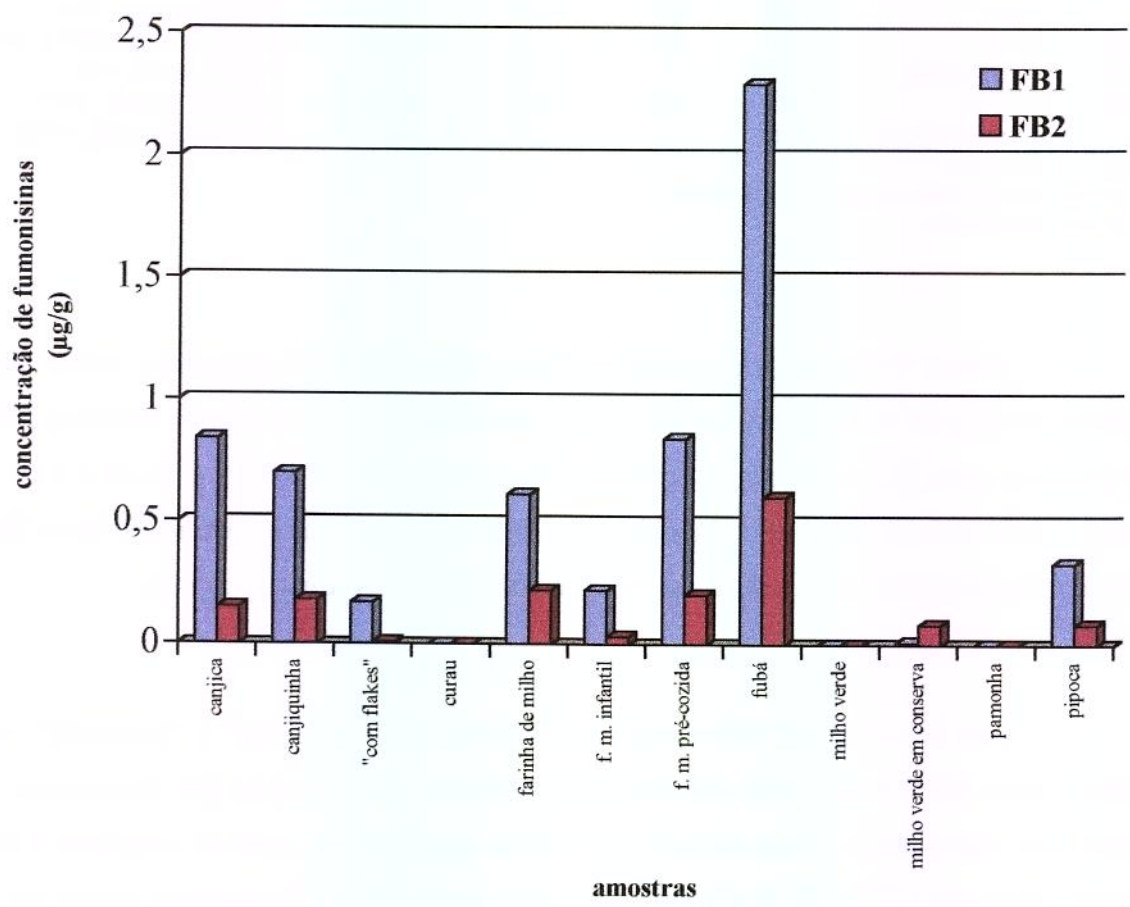


Figura 25 - Níveis médios de fumonisinas B₁ e B₂ encontrados em produtos alimentícios à base de milho em Campinas, Brasil.

Vários autores (BENNETT & RICHARD, 1996; CASTELO et alii, 1998b; JACKSON et alii, 1997; KATTA et alii, 1999) indicam que a FB₁ é termooestável. Em condições de frituras e cozimento ocorre pequena perda de FB₁. No entanto, sob condições mais extremas, altas temperaturas e tempo prolongado, tem diminuído a contaminação de FB₁ para níveis não detectáveis, por exemplo, a 220°C por 25 minutos (BENNETT & RICHARD, 1996).

A figura 26 demonstra o padrão de distribuição dos teores de fumonisinas isoladas e combinadas determinadas em 81 amostras de produtos alimentícios à base de milho. Em termos mundiais não há regulamentação para níveis de fumonisinas em alimentos, com exceção da Suíça, a qual propôs um limite de tolerância temporário de 1 µg/g para a somatória de FB₁ e FB₂ (FAO, 1997). No presente levantamento 21 amostras (25,9%) encontravam-se contaminadas com fumonisinas em níveis acima de 1 µg/g, entre elas: 3 de canjica, 1 de canjiquinha, 5 de farinha de milho, 3 de farinha de milho pré-cozida, 8 de fubá e 1 de pipoca. O mais alto valor encontrado foi de 6,31 µg/g de FB₁+FB₂ em uma amostra de fubá. Trinta e sete amostras (45,6%), entre elas: milho verde, pamonha, curau e “corn flakes” apresentaram níveis de FB₁+FB₂ abaixo de 0,1 µg/g. Estes resultados são consistentes aos níveis totais relatados nas 35 amostras dos Estados Unidos analisadas por SYDENHAM et alii (1991) e nas 29 amostras relatadas por DOKO & VISCONTI (1994) na Itália.

A razão FB₂/FB₁ nas amostras de alimentos analisadas variou de 0,045 a 3,5, com uma média de 0,54±0,83 e mediana de 0,26. Este resultado sugere que pode haver uma razão constante entre as fumonisinas nos alimentos como o observado no milho de campo, semelhante ao encontrado por HOPMANS & MURPHY (1993).

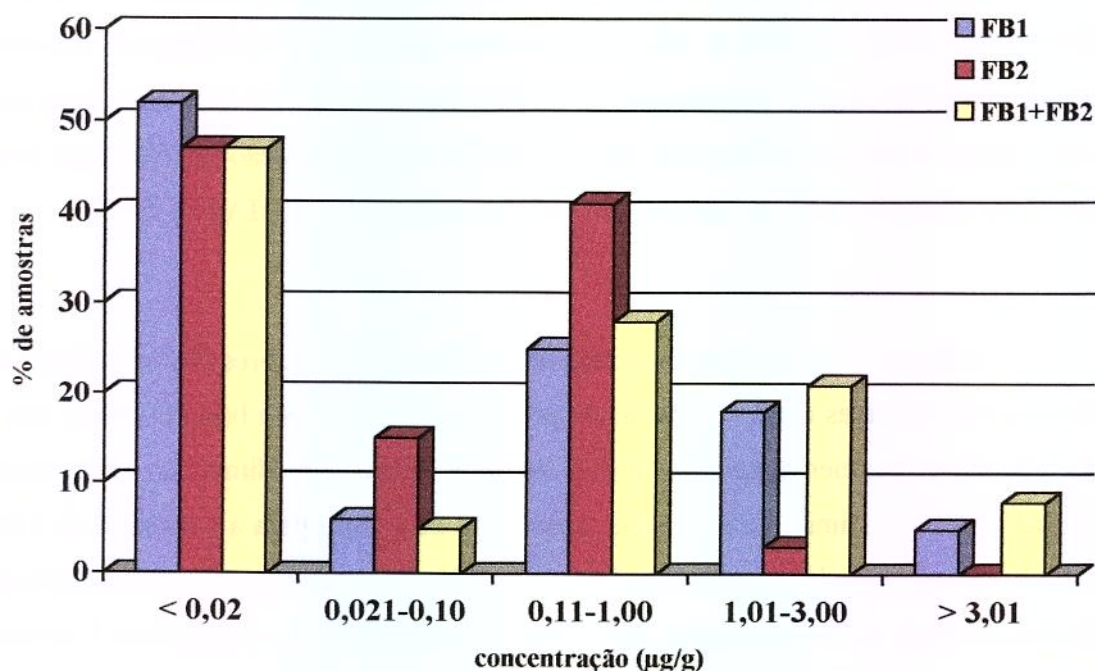


Figura 26 - Distribuição de frequência da contaminação por fumonisinas B₁, B₂, B₁+B₂ em 81 produtos alimentícios à base de milho adquiridos no comércio de Campinas, Brasil.

Dados do IBGE (1977) mostram que o consumo de fubá nas áreas metropolitanas varia de 2 a 12 g/dia/pessoa. Já nas áreas rurais este consumo é maior, variando de 11 a 39 g. O consumo de milho seco em grão, por sua vez, está em torno de 1 g por pessoa em regiões metropolitanas e varia de 1 a 22 g em regiões rurais. GELDERBLOM et alii (1996) propuseram uma Ingestão Diária Tolerável (TDI) de 0,8 µg/kg de peso corpóreo/dia para FB₁. Em regiões rurais onde o consumo de fubá é mais elevado (39 g/pessoa) a ingestão de FB₁ por um adulto de 70 kg seria de 89,31 µg (média de FB₁ em fubá = 2,29 x 39g), o que resulta em uma Ingestão Diária Provável (PDI) de 1,276 µg/kg p.c./dia, ultrapassando a TDI proposta. Nestas mesmas regiões outros produtos de milho, provavelmente tão contaminados como o fubá são também consumidos, como por exemplo o milho seco em grão, o que elevaria a ingestão diária de FB₁. Crianças estariam especialmente em risco nestas áreas. Já em regiões metropolitanas onde a ingestão de produtos de milho é caracteristicamente mais baixa, a ingestão diária por um adulto

de 70 kg seria, no pior caso, de 27,48 μg de FB_1 , resultando uma PDI de 0,3921 $\mu\text{g}/\text{kg p.c./dia}$ e portanto abaixo da TDI recomendada. Nestas regiões metropolitanas o consumo de outros produtos de milho são também baixos o que contribuiria para manter o risco também baixo para a população. Dados sobre o consumo de diversos produtos de milho são inexistentes porém, com os dados, apesar de antigos, sobre o consumo de fubá, milho seco e milho verde, a situação já se mostra suficientemente grave e recomenda que medidas de proteção a saúde do consumidor brasileiro sejam tomadas por parte dos órgãos responsáveis por assuntos agrícolas e de saúde pública.

CONCLUSÕES

O presente trabalho é o primeiro relato sobre a incidência de fumonisinas em produtos alimentícios à base de milho vendidos comercialmente no Brasil. Os resultados mostram que as fumonisinas estão presentes nos produtos alimentícios à base de milho em níveis que mostram uma ampla variação.

O presente levantamento indica que os consumidores de alguns produtos alimentícios à base de milho disponíveis nos mercados do Brasil, como o fubá, estão expostos às fumonisinas em níveis acima dos presentemente avaliados como seguros, especialmente habitantes das áreas rurais. Em áreas metropolitanas, no entanto, o risco é menor devido ao baixo consumo de produtos de milho.

Os alimentos examinados mostraram que em produtos de milho colhido no estágio leitoso, a presença de fumonisinas não foi detectável ou apareceu em níveis muito baixos (milho verde, milho doce em lata, curau e pamonha). Já em produtos à base de milho que atingiu a maturidade e que receberam pouco processamento, os valores são os mais elevados (fubá, canjica, canjiquinha e farinha de milho) e oferecem risco para a população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ABBAS, H.K., OCAMB, C.M. First report of production of fumonisin B₁ by *Fusarium polyphialidicum* collected from seeds of *Pinus strobus*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, p. 642, 1995.
02. ABBAS, H.K., OCAMB, C.M., XIE, W., MIROCHA, C.J., SHIER, W.T. First report of fumonisin B₁, B₂, and B₃ production by *Fusarium oxysporum* var. *redolens*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, p. 968, 1995.
03. BENNETT, G.A., RICHARD, J.L. Influence of processing on *Fusarium* mycotoxins in contaminated grains. **Food Technology**, Chicago, v. 50, n. 5, p. 235-238, May 1996.
04. BENNETT, G.A., RICHARD, J.L., ECKHOFF, S.A. Distribution of fumonisins in food and feed products prepared from contaminated corn. In: JACKSON, L.S., DEVRIES, J.W., BULLERMAN, L.B., eds. **Fumonisin in food**. New York: Plenum Press, 1996, pp. 317-322.
05. BEZUIDENHOUT, S.C., GELDERBLOM, W.C.A., GORST-ALLMAN, C.P., HORAK, R.M., MARASAS, W.F.O., SPITELLER, G., VLEGGAAR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society Chemical Communications**, Cambridge, v. 11, p. 743-745, 1988.
06. BUCCI, T., HANSEN, D.K., LABORDE, J.B. Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin fumonisin B₁. **Natural Toxins**, New York, v. 4, n. 1, p. 51-52, 1996.
07. CAMARGOS, S.M., MACHINSKI Jr., M., SOARES, L.M.V. Otimização de métodos para determinação de fumonisinas B₁ e B₂ em milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, no prelo.
08. CAMARGOS, S.M., SOARES, L.M.V., SAWASAKI, E., BORTOLETTO, N., GUMERATO, H.M. Incidência de fumonisinas B₁ e B₂ em 35 variedades de milho cultivadas na estação experimental do Instituto Agrônomo em Votuporanga, Estado de São Paulo, na safra de 94/95. **Livro de resumos do IX Encontro Nacional de Micotoxinas**, Florianópolis, 1998, p. 125.
09. CASTELO, M.M., SUMNER, S.S., BULLERMAN, L.B. Occurrence of fumonisins in corn-based food products. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 6, p. 704-707, 1998a.
10. CASTELO, M.M., SUMNER, S.S., BULLERMAN, L.B. Stability of fumonisin in thermally processed corn products. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 8, p. 1030-1033, 1998b.

11. CAWOOD, M.E., GELDERBLOM, W.C.A., VLEGGAR, R., BEHREND, Y., THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O. Isolation of the fumonisin mycotoxins - a quantitative approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, n. 11, p. 1958-1962, 1991.
12. CHEN, J., MIROCHA, C.J., XIE, W., HOGGLE, L., OLSON, D. Production of the mycotoxin fumonisin B₁ by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 12, p. 3928-3931, Dec. 1992.
13. CHU, F.S. Immunochemical methods for fumonisins. In: JACKSON, L.S., DEVRIES, J.W., BULLERMAN, L.B. eds. **Fumonisin in food**. New York: Plenum Press, 1996, pp. 123-133.
14. CHU, F.S., LI, G.Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidence of esophageal cancer. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 3, p. 847-852, Mar. 1994.
15. CHULZE, S.N., RAMIREZ, M.L., FARNOCHI, M.C., PASCALE, M., VISCONTI, A., MARCH, G. *Fusarium* and fumonisin occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 9, p. 2797-2801, 1996.
16. COLVIN, B.M., HARRISON, L.R. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, n. 1-2, p. 79-82, 1992.
17. DOKO, M.B., VISCONTI, A. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 11, n. 4, p. 433-439, 1994.
18. FAO, FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. **Worldwide regulations for mycotoxins 1995. A compendium. Food and Nutrition paper**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, paper 64, 1997.
19. GELDERBLOM, W.C.A., JASKIEWICZ, K., MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G., HORAK, R.M., VLEGGARR, R., KRIEK, N.P.J. Fumonisin - novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 7, p. 1806-1811, July 1988.
20. GELDERBLOM, W.C.A., KRIEK, N.P.J., MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁, in rats. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 12, n. 7, p. 1247-1251, 1991.
21. GELDERBLOM, W.C.A., SNYMAN, S.D., ABEL, S., LEBEPE-MAZUR, S., SMUTS, C.M., Van der WESTHUIZEN, L., MARASAS, W.F.O., VICTOR, T.C.,

- KNASMÜLLER, S., HUBER, W. Hepatotoxicity and carcinogenicity of the fumonisin in rats. In: JACKSON, L.S., DEVRIES, J.W., BULLERMAN, L.B., eds. **Fumonisin in food**. New York: Plenum Press, 1996, pp. 279-296.
22. HARRISON, L.R., COLVIN, B.M., GREENE, J.T., NEWMAN, L.E., COLE, J.R. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Turlock, v. 2, n. 3, p. 217-221, 1990.
 23. HIROOKA, E.Y., YAMAGUSHI, M.M., AOYAMA, S., SUGIURA, Y., UENO, Y. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 2, p. 173-183, Feb-Mar. 1996.
 24. HOPMANS, E.C., MURPHY, P.A. Detection of fumonisins B₁, B₂ and B₃ and hydrolyzed fumonisin B₁ in corn-containing foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 41, n. 10, p. 1655-1658, 1993.
 25. IARC, Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, vol 56, Lyon: IARC, 1993.
 26. IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, Estudo Nacional da Despesa Familiar, volumes 1-5, 1977.
 27. JACKSON, L.S., KATTA, S.K., FINGERHUT, D.D., DEVRIES, J.W., BULLERMAN, L.B. Effects of baking and frying on the fumonisin B₁ content of corn-based foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, n. 12, p. 4800-4805, 1997.
 28. KATTA, S.K., JACKSON, L.S., SUMNER, S.S., HANNA, M.A., BULLERMAN, L.B. Effect of temperature and screw speed on stability of fumonisin B₁ in extrusion-cooked corn grits. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 76, n. 1, p. 16-20, 1999.
 29. KELLERMAN, T.S., MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G., GELDERBLUM, W.C.A., CAWOOD, M.E., COETZER, J.A.W. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B₁. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Onderstepoort, v. 57, n. 4, p. 269-275, 1990.
 30. MACHINSKI Jr., M., SOARES, L.M.V., SAWASAKI, E., SORTI, G.D., CASTRO, J.L., BORTOLETTO, N. Ocorrência de fumonisinas B₁ e B₂ em milho plantado no Estado de São Paulo. **Livro de resumos do IX Encontro Nacional de Micotoxinas**, Florianópolis, 1998, p. 114.
 31. MUSSER, S.M., PLATTNER, R.D. Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium nygamai*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, n. 4, p. 1169-1173, 1997.

32. NELSON, P.E., PLATTNER, D.D., SHACKELFORD, D.D., DESJARDINS, A.E. Fumonisin B₁ production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 3, p. 984-989, 1992.
33. ONO, E.Y.S. **Microbiota fúngica, fumonisinas e efeito de armazenagem em milho**, Londrina, 1999 (Tese de Doutorado – Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina).
34. ORSI, R.B., CORREA, B., POZZI, C.R., SCHAMMAS, A.E., 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**, Kidlington, v. 36, p. 75-87, 2000.
35. PATEL, S., HAZEL, C.M., WINTERTON, A.G.M., GLEADLE, A.E. Surveillance of fumonisins in UK maize-based foods and other cereals. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 14, n. 2, p. 187-191, 1997.
36. PETSKA, J.J., AZCONA-OLIVERA, 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**, Des Moines, v. 57, n. 2, p. 169-172, Feb. 1994.
37. PIÑEIRO, M.S., SILVA, G.E., SCOTT, P.M., LAWRENCE, G.A., STACK, M.E. Fumonisin levels in Uruguayan corn products. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 80, n. 4, p. 825-828, 1997.
38. PITTET, A., PARISOD, V., SCHELLENBERG, M. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn-based products from the Swiss market. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, n. 8, p. 1352-1354, 1992.
39. PLATTNER, R.D., NORRED, W.P., BACON, C.W., VOSS, K.A., PETERSON, R., SHACKELFORD, D.D., WEISLEDER, D. A method of detection of fumonisin in corn samples associated with field cases of equine leukoencephalomalacia. **Mycologia**, New York, v. 82, n. 6, p. 698-702, 1990.
40. RICE, L.G., ROSS, P.F., DEJONG, J., PLATTNER, R.D., COATS, J.R. Evaluation of a liquid chromatographic method for the determination of fumonisins in corn, poultry feed, and *Fusarium* culture material. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 78, n. 4, p. 1002-1009, 1995.
41. RHEEDER, J.P., MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G., SYDENHAM, E.W., SHEPHARD, G.S., Van SCHALKWYK, D.J. *Fusarium moniliforme* and the fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, p. 353-357, 1992.

42. ROSS, P.F., RICE, L.G., OSWEILER, G.D., NELSON, P.E., RICHARD, J.L., WILSON, T.M. A review and update of animal toxicoses associated with fumonisin-contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, n. 1-2, p. 109-114, 1992.
43. ROTTINGHAUS, G.E., COATNEY, C.E., MINOR, H.C. A rapid, sensitive thin layer chromatography procedure for the detection of fumonisin B₁ and B₂. **Journal of Veterinary Diagnostics Investigation**, Turlock, v. 4, n. 3, p. 326-329, 1992.
44. SANCHIS, V., ABADIAS, M., ONCINS, L., SALA, N., VIÑAS, I., CANELA, R. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn-based products from the Spanish market. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 6, p. 2147-2148, June 1994.
45. SEO, J.A., LEE, Y.W. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 3, p. 1331-1334, Mar. 1999.
46. SHEPHARD, G.S., SYDENHAM, E.W., THIEL, P.G., GELDERBLOM, W.C.A. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, New York, v. 13, n. 10, p. 2077-2087, Oct. 1990.
47. SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., STOCKENSTRÖM, S., SYDENHAM, E.W. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 79, n. 3, p. 671-687, 1996.
48. STACK, M.E., EPPLEY, R.M. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn products. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 75, n. 5, p. 834-837, 1992.
49. SYDENHAM, E.C., GELDERBLOM, W.C.A., THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁ - a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, p. 285-290, 1990.
50. SYDENHAM, E.C., MARASAS, W.F.O., SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., HIROOKA, E.Y. Fumonisin concentrations in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, n. 6, p. 994-997, June 1992a.
51. SYDENHAM, E.C., SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂, and B₃ in foods and feeds. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 75, n. 2, p. 313-318, 1992b.

UNICAMP

184

BIBLIOTECA CENTRAL

SEÇÃO CIRCULANTE

52. SYDENHAM, E.W., SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O., STOCKENSTRÖM, S. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, n. 11, p. 2014-2018, 1991.
53. SYDENHAM, E.W., WESTUIZEN, L.V.D., STOCKENSTROM, S., SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G. Fumonisin-contaminated maize: Physical treatment for the partial decontamination of bulk shipments. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 11, p. 25-32, 1994.
54. TRUCKSESS, M.W., STACK, M.E., ALLEN, S., BARION, N. Immunoaffinity column coupled with liquid chromatography for determination of fumonisin B₁ in canned and frozen sweet corn. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 78, n. 3, p. 705-710, 1995.
55. UENO, Y., AOYAMA, S., SUGIURA, Y., WANG, D.S., LEE, U.S., HIROOKA, E.Y., HARA, S., KARKI, T., CHEN, G., YU, S.Z. A limited survey of fumonisin in corn and corn-based products in Asian countries. **Mycotoxin Research**, Mainz, v. 9, n. 1, p. 27-34, 1993.
56. VISCONTI, A., DOKO, M.B., BOTTALICO, C., SCHURER, B., BOENKE, A. Stability of fumonisins (FB₁ and FB₂) in solution. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 11, n. 4, p. 427-431, 1994.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE