

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FUMONISINAS EM PRODUTOS E EM VARIEDADES DE MILHO ARGENTINOS

Mara Rubia Hennigen
Farmacêutica-Bioquímica
Mestre em Bioquímica

Profa. Dra. Lucia Maria Valente Soares
Orientadora

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

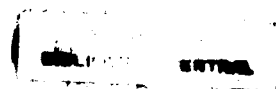
PARECER

Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida
por MARA RUBIA HENNIGEN
aprovada pela Comissão
Julgadora em 06 de novembro
de 1998.

Campinas, SP, 1998

Campinas, 06 de novembro de
1998

Lucia Maria Valente Soares
Profa. Dra. LÚCIA MARIA
VALENTE SOARES
Presidente da Banca



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V	Ex
T.º BC/	36.049
PR.º	395/98
C	D ☒
PR.º	R\$ 11.00
DAT.	18/12/98
N.º CPD	

CM-00119567-9

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

H393f

Hennigen, Mara Rubia

Fumonisinias em produtos e em variedades de milho
argentinos / Mara Rubia Hennigen. – Campinas, SP
[s.n.], 1998.

Orientador: Lúcia Maria Valente Soares
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Fumonisinias. 2.Milho – Argentina. 3.Farinhas.
I.Soures, Lúcia Maria Valente. II.Universidade Estadual
de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Leiria Valente Soares

Profa. Dra. Lucia Maria Valente Soares

~~(orientadora)~~

Prof. Dr. ~~Homero~~ Fonseca

(membro)

Dra. Myrna Sabino

(membro)

Prof. Dr. Benedito Correa

(membro)

m. curio au 7. Teich

Profa. Dra. Maria Cecília Figueiredo Toledo

(membro)

Profa. Dra. Heloisa Mascia Cecchi

(membro)

Profa. Dra. Celina Camargo

(membro)

Campinas,

de

de 1998.

Aos meus sobrinhos e ao Lucas

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Lúcia Maria Valente Soares, pela orientação, apoio e amizade.

Aos membros da banca examinadora, pelas sugestões na redação final da tese.

Ao Ministério da Agricultura e do Abastecimento pela oportunidade.

Ao CNPQ, pelo suporte financeiro ao desenvolvimento do trabalho, através da bolsa de estudos.

Ao Dr. Guillermo Eyherabide do Instituto de Tecnologia Agropecuária da Argentina, pela doação das amostras e fornecimento de dados pertinentes.

Ao Dr. Carlos Gonzales Nogueira e Licenciado Alberto Longhi do Laboratório Xenobióticos, Argentina, por ter posto a disposição as instalações do laboratório e pelo suporte financeiro para a realização das análises.

Aos colegas Neffer di Benedetto, Sandra Sanchez e Leandro Garcia do Laboratório Xenobióticos, Argentina, pela colaboração durante a realização das análises.

À Dra Marta Zanelli do Instituto de Tecnologia Agropecuária, da Argentina, pela realização das análises estatísticas.

Ao Licenciado Jorge Eduardo Torroba do Instituto Pan-Americano de Proteção de Alimentos e Zoonoses, Organização Pan-Americana de Saúde, pelos contatos e gestões junto às instituições argentinas.

À amiga Marta Z. Miranda, pelo apoio e colaboração.

Ao amigo Alexandre Wahl Hennigen, por ter posto à disposição seus conhecimentos de computação.

Às companheiras de grupo de espiritualidade do Movimento dos Focolares, pelo apoio em todas as horas.

ÍNDICE GERAL

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMO	1
SUMMARY	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. Propriedades físicas e químicas das fumonisinas	6
2.2. Metabólitos relacionados a fumonisinas	9
2.3. Fungos produtores, fatores que influenciam o seu desenvolvimento e fatores que induzem a produção de fumonisinas	11
2.4. Controle de fumonisinas no campo e na estocagem	15
2.5. Descontaminação	16
2.6. Efeitos tóxicos	18
2.6.1. Mecanismo de ação das fumonisinas	18
2.6.2. Toxicidade das fumonisinas em animais	22
2.6.3. Carcinogenicidade das fumonisinas – Câncer de esôfago	26
2.6.4. Fitotoxicidade das fumonisinas	28
2.7. Ocorrência de fumonisinas	28
2.7.1. Níveis de fumonisinas em rações animais associadas a micotoxicoses em animais	28
2.7.2. Níveis de fumonisinas em milho e produtos de milho destinado ao consumo humano	29
2.7.3. Ocorrência de fumonisinas na América do Sul	37
2.8. Metodologia analítica para determinação de fumonisinas	40
2.8.1. Estabilidade das soluções padrão de fumonisinas	40

2.8.2. Extração	40
2.8.3. Limpeza de extratos	41
2.8.4. Cromatografia	42
2.8.5. Imunoensaios	45
2.8.6. Eletroforese capilar	46
2.9. Referências Bibliográficas	47
3. FUMONISIN LEVELS IN CORN PRODUCTS OFFERED TO CONSUMERS IN BUENOS AIRES, ARGENTINA	71
4. INCIDENCE OF FUMONISINS IN MAIZE GENOTYPES GROWN IN ARGENTINA DURING TWO CONSECUTIVE SEASONS	79
ANEXOS	96

ÍNDICE DE TABELAS

Na Revisão Bibliográfica:

Tabela 1 - Níveis de fumonisinas em alimentos a base de milho para humanos	31
Tabela 2 - Níveis de fumonisinas em milho das safras de 1988, 1989, 1990 e 1991 em Iowa, Wisconsin e Illinois	33
Tabela 3 - Níveis de fumonisinas em milho das safras 1990 – 1991 no estado do Paraná	38

No artigo: Fumonisin levels in commercial corn products in Buenos Aires, Argentina

Table 1. Fumonisin B1 and B2 in commercial corn products in Buenos Aires, Argentina, during the period October 1996/January 1997.	77
---	----

Table 2. Fumonisin B1 and B2 in commercial corn products in Buenos Aires, Argentina, during 1998.	78
---	----

No artigo: Incidence of fumosins in maize genotypes grown in Argentina during two consecutive seasons.

Table 1. Intermediate cycle maize hybrids grown in Junin, Buenos Aires Province, Argentina, from October 1995 to April 1996: Characteristics and fumonsins B1 and B2 levels	90
---	----

Table 2. Intermediate cycle maize hybrids grown in Junin, Buenos Aires Province, Argentina, from October 1995 to April 1996: Characteristics and fumonsins B1 and B2 levels	91
---	----

Table 3. Intermediate cycle maize hybrids grown in Pergamino, Buenos Aires Province, Argentina, from October 1996 to April 1997: Characteristics and fumonsins B1 and B2 levels	92
Table 4. Full cycle maize hybrids grown in Pergamino, Buenos Aires Province, Argentina, from October 1996 to April 1997: Characteristics and levels of fumonsins B1 and B2	93
Table 5. Temperature, rainfall and relative humidity in the Junin Experimental Station during the corn growing season of 1995 – 1996.	94
Table 6. Temperature, rainfall, and relative humidity in the Pergamino Experimental Station during the corn growing season of 1996 – 1997.	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química das fumonisinas	6
Figura 2 - Equilíbrio pH – dependente entre a estrutura de cadeia aberta e estrutura cíclica do éster propano – 1,2,3 - tricarboxilado	9
Figura 3 - Estrutura química das AAL toxinas (alperisinas)	10
Figura 4 - Comparação das estruturas de Fumonisina B1 e B2, esfingosina e Esfinganina	19
Figura 5 - Mecanismo de inibição da biosíntese de esfingolipídios pelas fumonisinas	21

RESUMO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos três cereais de maior importância a nível mundial, depois do trigo e do arroz. Os Estados Unidos da América são responsáveis por cerca de 40% do total da produção mundial. São seguidos pela República Popular da China e pelo Brasil. A Argentina coloca no mercado 2% do total da produção mundial de milho. O cultivo deste cereal ocupa o terceiro lugar, tanto em relação a área cultivada, como em relação à produção agrícola daquele país, depois da soja e do trigo. Aproximadamente 50% da produção de milho argentino é destinada ao mercado de exportação, principalmente a países da Ásia e ao Brasil.

As fumonisinas são metabólitos tóxicos produzidos principalmente pelo *Fusarium moniliforme*, um fungo ubíquo, que comumente está presente no milho. As fumonisinas causam diversas micotoxicoses, tais como leucoencefalomalácia equina e edema pulmonar em suínos. A fumonisina B1 foi apontada como hepatocarcinogênica em ratos e causadora de hemorragia cerebral em coelhos. As fumonisinas tem sido detectadas em milho e em produtos a base de milho em várias partes do mundo. Além disso, a alta incidência de câncer de esôfago em humanos em regiões tais como Transkei, na África do Sul, e Linxian, na China, tem sido epidemiologicamente correlacionada com a presença de fumonisinas em produtos à base de milho que são consumidos nestas regiões.

O presente trabalho teve como primeiro objetivo coletar dados sobre o milho e produtos derivados produzidos por um país vizinho e importante parceiro comercial, com relação à incidência de fumonisinas. Um segundo objetivo do trabalho foi investigar fatores que possam influir na contaminação do milho no campo. Os fatores pesquisados foram: cultivar, tipo de endosperma, ciclo vegetativo, temperatura, umidade relativa e precipitação pluviométrica. Visando atingir estes objetivos foram investigados: a) os níveis de fumonisinas em produtos a base de milho oferecidos aos consumidores em Buenos Aires, Argentina; b) a incidência de fumonisinas em diferentes genótipos de milho cultivados na Argentina durante duas estações de plantio subsequentes.

Os níveis de fumonisina B1 e B2 foram determinados em 35 amostras de farinha de milho e canjica destinados ao consumo humano, adquiridos diretamente de pequenos mercados e supermercados durante o período de outubro de 1996 a janeiro de 1997 e durante o mês de janeiro de 1998. Durante o primeiro período de coleta, 16 das 19 amostras foram encontradas contaminadas. Considerando todas as 19 amostras, os níveis de contaminação variaram entre não detectado e 1869 ng/g FB1, com uma média de 300 ng/g, e entre não detectado e 768 ng/g, com uma média de 95 ng/g. Durante o segundo período, todas as 16 amostras estavam contaminadas com níveis entre 75 a 4987 ng/g FB1, com uma média de 844 ng/g e entre não detectado e 1818 ng/g FB2, com uma média de 304 ng/g. Os níveis de FB1 e FB2 nas amostras coletadas durante

janeiro de 1998 foram significativamente mais elevadas que nas amostras coletadas durante o período de outubro de 1996 a janeiro de 1997. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre amostras com marcas ou comercializadas à granel em termos de níveis de fumonisinas.

A ocorrência de fumonisinas B1 e B2 foi investigada em 37 híbridos de ciclo normal e 29 de ciclo intermediário cultivados em Junin e 42 híbridos de ciclo normal e 32 de ciclo intermediário cultivados em Pergamino, durante os períodos de outubro de 1995 a abril de 1996 e outubro de 1996 a abril de 1997, respectivamente. Os híbridos cultivados em Junin durante o primeiro período continham fumonisina B1 em níveis variando de não detectado a 838 ng/g (concentração média de 131 ng/g) para híbridos de milho de ciclo intermediário e de não detectado a 662 ng/g para FB2 (concentração média de 58 ng/g). Fumonisinas B1 e B2 variaram de não detectado a 470 ng/g para FB1 (concentração média de 62 ng/g) e de não detectado a 138 ng/g para FB2 (concentração média de 13 ng/g) para híbridos de ciclo normal. Os híbridos cultivados em Pergamino durante o segundo período do estudo continham fumonisinas B1 e B2 em níveis variando de 66 a 11160 ng/g de FB1 (concentração média de 3183 ng/g) e de 27 a 3526 ng/g para FB2 (concentração média de 995 ng/g) para híbridos de ciclo intermediário. Os níveis de contaminação variaram de 499 a 10791 ng/g para FB1 (concentração média de 3846 ng/g) e de 87 a 4597 ng/g para FB2 (concentração média de 1166 ng/g) para híbridos com ciclo normal. Quarenta e quatro híbridos foram plantados durante ambos os períodos. Nenhuma correlação foi encontrada entre os níveis de fumonisinas e tipo de endosperma, tipo de hibridização e ciclo vegetativo. Os níveis de fumonisinas assim como a umidade relativa média mensal foram significativamente diferentes de um período de cultivo para outro, porém o mesmo não ocorreu com a temperatura média mensal e o índice pluviométrico mensal.

SUMMARY

Corn, or maize (*Zea mays* L.), is the world third leading cereal crop, after wheat and rice. The United States produces nearly 40% of the total world production. The next largest corn-producing countries are the People's Republic of China and Brazil. Argentinean corn accounts for 2 percent of the total world production. In Argentina corn occupies a third of the cultivated area and ranks third among cereals, after soybean and wheat. About 50% of Argentinean corn is destined to export markets, mainly Asian countries and Brazil.

Fumonisin is a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*, which occurs widely in corn. They cause mycotoxicosis in animals, such as equine leukoencephalomalacia and porcine pulmonary edema. Fumonisin B1 has been shown to be hepatocarcinogenic to rats. Fumonisin appears to be endemic in corn and has been detected in a wide array of corn-based products. In addition, the high incidence of human esophageal cancer in certain parts of the world, such as in Transkei, South Africa, and in Linxian, China, has been correlated with fumonisin presence in the food consumed locally.

The first aim of the present work was to collect data on fumonisin incidence on corn and corn products produced by a neighbouring country which is also an important Brazilian commercial partner. A second objective was to investigate possible factors responsible for fumonisin production in the field. The factors chosen were: cultivar, endosperm type, vegetative cycle length, temperature, relative humidity, and rainfall. With these objectives in mind (a) Fumonisin levels were investigated in corn products offered to consumers in Buenos Aires, Argentina, and (b) Maize genotypes grown in Argentina during two consecutive growing seasons were examined for the incidence of fumonisin.

Fumonisin B1 and B2 were determined in 35 samples of corn flour and corn grits destined to human consumption and purchased directly from Buenos Aires food shops and supermarkets during October 1996 to January 1997 and during the month of January 1998. During the first period of sample collecting, 16 out of 19 samples were found contaminated. Considering all 19 samples contamination levels were between not detected and 1860 ng/g FB1, with an average of 300 ng/g, and from not detected to 768 ng/g FB2, with an average of 95 ng/g. During the second period all 16 samples were found contaminated with levels ranging from 75 to 4987 ng/g FB1, with an average of 844 ng/g, and from not detected to 1818 ng/g FB2, with an average of 304 ng/g. The levels of FB1 and FB2 in the samples collected during January 1998 were significantly higher than the samples collected during the period of October 1996 to January 1997. No significant difference was found in terms of fumonisin levels between the branded and the unbranded samples.

The natural occurrence of fumonisin B1 (FB1) and fumonisin B2 (FB2) has been investigated in 37 full cycle hybrids and 29 intermediate cycle hybrids grown in Junin, and 42 full cycle hybrids and 32 intermediate cycle hybrids grown in Pergamino during the growing season of October 1995 to April 1996 and the growing season of October 1996 to April 1997, respectively. The maize hybrids grown in Junin during the first season contained fumonisin B1 at levels ranging from not detected to 838 ng/g (mean concentration 131 ng/g) for intermediate cycle maize hybrids and from not detected to 662 ng/g for FB2 (mean concentration 58 ng/g). Fumonisin B1 and B2 ranged from not detected to 470 ng/g for FB1 (mean concentration of 62 ng/g) and from not detected to 138 ng/g for FB2 (mean concentration of 13 ng/g) for full cycle maize hybrids. The maize hybrids grown in Pergamino during the second season contained fumonisins B1 and B2 at levels ranging from 66 to 11160 ng/g for FB1 (mean concentration of 3183 ng/g) and from 27 to 3526 ng/g for FB2 (mean concentration of 995 ng/g) for intermediate cycle maize hybrids. The levels of contamination ranged from 499 to 10791 ng/g for FB1 (mean concentration of 3846 ng/g) and from 87 to 4597 ng/g for FB2 (mean concentration of 1166 ng/g) for full cycle maize hybrids. Forty four of the corn hybrids were planted during both growing seasons. No correlation was found between fumonisins levels and endosperm type, number of crosses of the hybrid, and vegetative cycle length. The fumonisins levels were significantly different from one growing season to the other as was the average monthly relative humidity but not the average monthly temperature and the total monthly rainfall.

1. INTRODUÇÃO

As fumonisinas são metabólitos tóxicos produzidos principalmente por *Fusarium moniliforme* e *F. proliferatum*, os quais freqüentemente são responsáveis por infecções assintomáticas em milho. As fumonisinas causam leucoencefalomalácia equina, edema pulmonar em suínos e hemorragia cerebral em coelhos. A fumonisina B1 provoca ainda hepatocarcinomas em ratos. A alta incidência de câncer de esôfago em humanos em algumas regiões do mundo, tais como Transkei, na África do Sul e Linxian, na China, tem sido epidemiologicamente correlacionada com a presença de fumonisinas em alimentos à base de milho. As fumonisinas têm sido detectadas em milho e produtos à base de milho em várias partes do mundo.

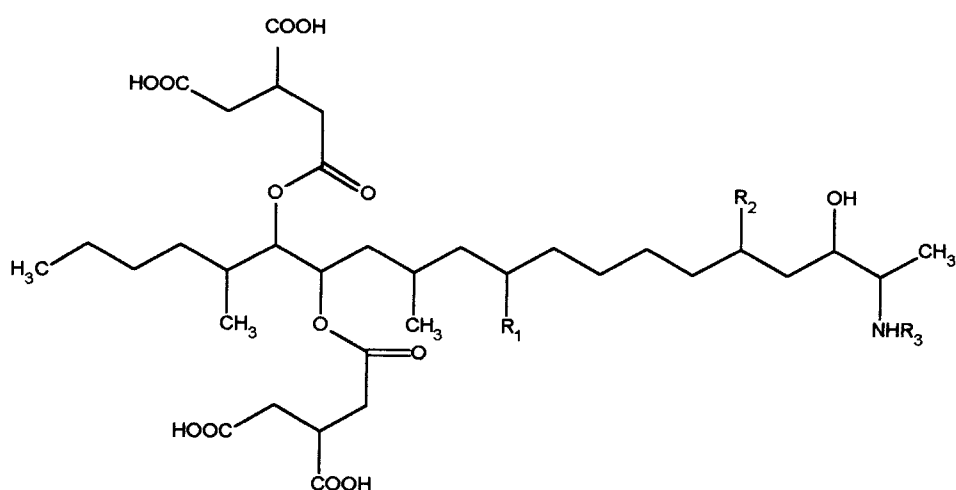
O milho (*Zea mays* L.) é um dos três cereais de maior importância a nível mundial, depois do trigo e do arroz, com uma produção anual de 495 milhões de toneladas. Os Estados Unidos da América são responsáveis por cerca de 40% do total da produção mundial. São seguidos pela República Popular da China e pelo Brasil. No Brasil, o milho é o cereal mais cultivado, com uma produção anual de cerca de 30 milhões de toneladas. A maior parte é destinada à alimentação animal, constituindo 63% da ração para aves e 75% da ração para suínos. A Argentina produz 2% do total da produção mundial de milho e o cultivo deste cereal ocupa o terceiro lugar em relação a área cultivada e a produção agrícola daquele país, depois da soja e trigo. Aproximadamente 50% da produção de milho argentino é destinada ao mercado de exportação, principalmente a países da Ásia e ao Brasil.

O intenso comércio entre países é uma realidade na economia global dos dias de hoje. Dentro dos blocos econômicos que estão sendo formados, dos quais o Mercosul é um exemplo, as barreiras comerciais se restringem e há um trânsito livre de mercadorias. O Brasil é o maior importador de produtos argentinos no momento atual. Com especial peso na sanidade de produtos agrícolas importados está a possibilidade de contaminação por micotoxinas. As condições climáticas, por sua vez, têm importância crucial no aparecimento de micotoxinas em produtos agrícolas. O clima argentino difere marcadamente dos tipos de clima que imperam na maioria das regiões brasileiras. Apenas o clima do estado do Rio Grande do Sul tem alguns pontos em comum com o clima argentino. Como uma consequência natural destas diferenças, as cultivares de milho utilizadas na Argentina são diferentes das utilizadas nas diversas regiões agrícolas brasileiras. Por outro lado pouco se sabe sobre os fatores que influenciam a produção de fumonisinas em milho no campo. Estudos sobre o assunto constituem portanto uma necessidade atual. Como consequência deste quadro, os objetivos do presente trabalho foram pesquisar a incidência de fumonisinas no milho produzido na Argentina e estudar a influência de fatores bióticos e abióticos na produção de fumonisinas B1 e B2 em milho no campo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Propriedades físicas e químicas das fumonisinas

As fumonisinas são metabólitos secundários produzidos principalmente por *Fusarium moniliforme* Sheldon e *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg, fungos ubíquos na natureza e isolados frequentemente de milho, alimentos à base de milho e rações (Shepard et alii, 1996). Até o momento foram isoladas e quimicamente caracterizadas 7 fumonisinas: B1 (FB1), B2 (FB2), B3 (FB3), B4 (FB4), A1 (FA1), Fumonisina A2 (FA2) (Cawood et alii, 1991) e C (FC) (Branham & Plattner, 1993). Entretanto, as fumonisinas B1, B2 e B3, são as mais encontradas em cultivo de fungos ou em milho naturalmente contaminado (Shepard et alii, 1996). As estruturas químicas são apresentadas na Figura 1.



FUMONISINA	R1	R2	R3
B1	OH	OH	H
B2	H	OH	H
B3	OH	H	H
B4	H	H	H
A1	OH	OH	CH ₂ CO
A2	H	OH	CH ₂ CO

Figura 1. Estrutura química das fumonisinas

A estereoquímica das fumonisinas B1, B2, B3 e B4 foi estabelecida por Beier et alii (1995) através de métodos de modelagem molecular, que fornecem as conformações tridimensionais de mais baixa energia. As fumonisinas A1 e A2 são derivados N - acetilados (amidas) das fumonisinas

B1 e B2, respectivamente. As fumonisinas B1, B2, B3 e B4 apresentam uma amina primária livre na posição C2 da cadeia com 20 átomos de carbono e esterificação pelo ácido tricarbálico nas posições C14 e C15, assim como metilação nas posições C12 e C16. Os membros da série B diferem em número e localização dos grupos hidroxila. A FB1 possui grupos hidroxila em C10, C5 e C3, e é a mais polar da série B (Cawood et alii, 1991). A FB2 possui grupos hidroxila em C3 e C5 e a FB3 em C10 e C3. A FB4 possui grupos hidroxila na cadeia carbônica em C3. A fumonisina C apresenta uma amina primária livre na posição C1 da cadeia com 20 átomos de carbono, esterificação pelo ácido tricarbálico nas posições C13 e C14, metilação em C11 e C15, e grupos hidroxila em C2, C4 e C9.

As fumonisinas são compostos fortemente polares, solúveis em água, metanol e em acetonitrila/água. Não são solúveis em solventes apolares. São hidrolisadas quando submetidas ao aquecimento com HCL 6N ou KOH 0,05 - 2M, produzindo o ácido tricarbálico (ácido 1, 2, 3 tricarboxílicopropano) e o aminopoliol correspondente (aminopentol para FB1 e aminotetraol para FB2 e FB3 (Bezuidenhout et alii, 1988; Jackson & Bennett, 1990; Plattner et alii, 1990, 1992; Sydenham et alii, 1990a,b). As fumonisinas B1 e B2 são descritas como sólidos amorfos (Gelderblom et alii, 1988). Vesonder et alii (1992) relataram o ponto de fusão da FB1 como sendo 103 -105°C, a rotação específica $[\alpha]_D$ de -28° (concentração de 2 mg/ml de água) e que o espectro infravermelho (em pastilha de KBr) inclui máximos de absorvância em 3450, 2934, 1729, e 1632 cm^{-1} .

As fumonisinas B1 e B2 foram isoladas e caracterizadas a partir de extratos metanólico/aquosos de culturas de *F. moniliforme* MCR 826, obtido de milho de Transkey, África do Sul (Bezuidenhout et alii, 1988; Gelderblom et alii, 1988).

Bezuidenhout et alii (1988) e Gelderblom et alii (1988) relataram uma técnica de produção e isolamento de fumonisinas. Primeiramente culturas de *F. moniliforme* MRC 826 foram inoculadas em milho esterilizado. As culturas, após o período necessário para um acúmulo das toxinas no meio, foram então extraídas com metanol/água. O extrato obtido mostrou atividade de iniciação/promoção de câncer em fígado de rato em testes histopatológicos e bioensaios. O fracionamento do extrato em resina poliestirênica macroreticular (XAD-2), Sephadex LH-20 e cromatografia em fase reversa resultou no isolamento de uma mistura de fumonisinas. Tratando-se as fumonisinas com excesso de diazometano foi conseguida uma purificação maior das toxinas, resultando em ésteres tetrametílicos na forma de óleos incolores.

O desenvolvimento de técnicas para isolamento das fumonisinas B1 e B2 resultou na descoberta da FB3 e da FB4 em extratos de *F. moniliforme* MRC 826 (Cawood et alii, 1991; Plattner

et alii, 1992). Cawood et alii (1991) isolaram as fumonisinas A1 e fumonisina A2 e também determinaram as suas estruturas químicas. Estas fumonisinas já haviam sido observadas durante o isolamento da FB1 e da FB2 (Gelderblom et alii, 1988 e Bezuidenhout et alii, 1988).

Durante o processo de isolamento das fumonisinas formam-se outros compostos, como, por exemplo, ésteres mono e di-metil da FB1 e FB2, devido à presença do metanol. Esses compostos interferem na purificação do FB2, FB3 e FB4, pois possuem comportamento cromatográfico similar em sílica gel e em octadecilsilil (Cawood et alii, 1991).

Os membros da série A são derivados N - acetilados das FB1 e FB2. Plattner et alii (1992) consideraram que as FA1 e FA2 podem ser artefatos produzidos durante o isolamento das fumonisinas, provavelmente devido a presença de ácido acético na etapa de cromatografia em coluna de sílica. Bezuidenhout et alii (1988) e Gelderblom et alii (1988) não detectaram as fumonisinas A1 e A2 em culturas ou amostras naturalmente contaminadas. No entanto, esses autores, obtiveram FA1 e FA2 após separação em coluna de sílica gel e o espectro de ressonância nuclear magnética (RNM) indicou que esses compostos são derivados N-acetilados de FB1 e FB2, respectivamente. Confirmando, na opinião dos autores que são metabólitos produzidos por *F. moniliforme* em cultura. Cawood et alii (1991) opinou que não existe nenhuma indicação de que FB1 e FB2 sejam convertidas em FA1 e FA2, respectivamente, devido a presença de ácido acético, mesmo quando a FB1 e a FB2 são mantidas a temperaturas de 60°C ().

A espectrometria de ressonância nuclear magnética tem sido empregada para a determinação da estrutura química e para a verificação da pureza de fumonisinas isoladas (Bezuidenhout et alii, 1988; Laurent et alii, 1990; Plattner et alii, 1990, 1992). Plattner et alii (1992) comparou o espectro ^{13}C RNM da FB1 das FB1, FB2 e FB3 em D_2O e os produtos de hidrólise (aminopolióis). As variações observadas no espectro ^{13}C NMR da FB1 com a mudança do pH foram atribuídas à presença em equilíbrio entre a estrutura cíclica e a linear do ácido tricarbálico (ácido 1,2,3-propanotricarboxílico) (Figura 2). O espectro de ^1H NMR da FB1 foi publicado por Laurent et alii (1990) e Plattner et alii (1990, 1992). Laurent et alii (1990) demonstrou presença de interações entre os grupos COO^- e NH_3^+ em solução de água deuterada e propõe uma forma globular para a molécula de FB1 (macrofusina).



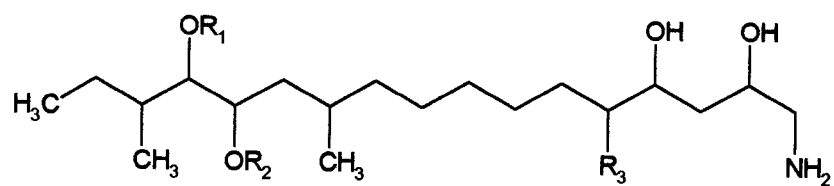
Figura 2. Equilíbrio pH - dependente entre a estrutura de cadeia aberta e a estrutura cíclica do éster propano - 1,2,3 - tricarboxilato

2.2. Metabólitos relacionados às fumonisinas

Existem metabólitos fúngicos que possuem estruturas químicas semelhantes à estrutura das fumonisinas (Scott, 1993; Riley et alii, 1993). As fitotoxinas TA-1, TA-2, TB-1 e TB-2 (Figura 3) são produzidas por *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* (Bottini et alii, 1981; Siler e Gilchrist, 1983). São fitotoxinas, também conhecidas por AAL-toxinas, denominadas alperisinas A1, A2, B1 e B2 (Shephard et alii, 1992).

A estrutura química e a atividade biológica *in vitro* das AAL-toxinas e das fumonisinas são muito similares. As AAL-toxinas (TA-1 e TA-2) são monoésteres de ácido tricarboxílico propano e 1 - amino - 11, 15 - dimetil - 2, 4, 5, 13, 14, pentahidroxiheptadecano (PM = 521). A única porção de ácido propanotricarboxílico é esterificada nas posições C13 (TA-1) ou C14 (TA-2) da cadeia de 17 carbonos. Existe também uma série TB (TB-1 e TB-2) que difere da série TA devido a falta do C5 hidroxil e pela estereoquímica diferente (Bottini et alii, 1981). A FB1 é um diéster do ácido propano 1,2,3-tricarboxílico e 2-amino-12,16-dimetil 3,5,10,14,15 pentaidroxicosano (PM=721). As porções ácidas propanotricarboxílicas são esterificadas nas posições C14 e C15 da cadeia de 20 carbonos.

Outros metabólitos fúngicos estruturalmente relacionados às fumonisinas são as esfingofunginas A, B, C e D (VanMiddles Worth et alii, 1992 a,b) e fumifungina (Mukhopadhyay et alii, 1987), antibiótico antifúngico produzido por *Aspergillus fumigatus*.



	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>
<i>TA-1</i>	H	CH ₂ (COOH)CH(COOH)CH ₂ CO	OH
<i>TA-2</i>	CH ₂ (COOH)CH(COOH)CH ₂ CO	H	OH
<i>TB-1</i>	H	CH ₂ (COOH)CH(COOH)CH ₂ CO	H
<i>TB-2</i>	CH ₂ (COOH)CH(COOH)CH ₂ CO	H	H

Figura 3. Estrutura química das AAL toxinas (alperisinas)

2.3. Fungos produtores, fatores que influenciam no seu desenvolvimento e fatores que induzem a produção de fumonisinas

As diferentes espécies do gênero *Fusarium* estão amplamente difundidas no solo e em substratos orgânicos, foram isoladas em diferentes condições climáticas e possuem a capacidade de mudança morfológica e fisiológica muito rápida quando em um novo ambiente, (Blaney, 1991).

Fusarium moniliforme Sheldon, anamórfico de *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wr. é um patógeno do milho (*Zea mays* L.). Porém, também ocorre como saprófita (Nyvall et alii, 1970). É o fungo de maior ocorrência no milho e possui capacidade de produzir infecções assintomáticas, dependendo do cultivar do milho, linhagem do fungo e fatores ambientais. Em razão da infecção pelo fungo ser assintomática, as toxinas produzidas entram na cadeia alimentar animal e humana, podendo causar toxicoses (Bacon & Williamson, 1992).

Conforme Blaney (1991), *F. moniliforme* desenvolve-se em zonas temperadas úmidas e sub-úmidas, nos trópicos e sub - trópicos, mas é incomum em zonas temperadas mais frias. É um fungo comumente encontrado no milho em diferentes partes do mundo e um dos principais contaminantes do arroz, cana-de-açúcar e sorgo. Também ocorre em bananas, abacaxi e tomate estocados. Ross et alii (1990) constataram também a produção de fumonisinas B1 e B2 por *F. proliferatum*.

A produção de fumonisinas tem sido constatada em cultivos de diferentes cepas de *F. moniliforme* e, embora exista variação na quantidade de fumonisina produzida, diferentes cepas tem exibido potencial para produção destas toxinas em diversos substratos e áreas geográficas (Nelson et alii, 1991; Sydenham et alii, 1992b; Thiel et alii, 1991b; Le Bars et alii, 1994; Visconti & Doko, 1994a).

Nelson et alii (1991) estudaram o potencial toxigênico de 95 cepas de *F. moniliforme* provenientes de diversas áreas geográficas em diferentes substratos e obtiveram resultados que demonstraram que o potencial toxigênico parece depender mais da área de origem do que do substrato. Diferentes cepas provenientes da África, Ásia e América do Norte produziram quantidades significativas de FB1, mas, outras cepas, principalmente da África e Austrália, produziram baixos níveis ou não produziram FB1.

Leslie (1991) utilizou a formação do estágio sexual para distinguir as espécies. Em *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Ito (o estágio perfeito associado com isolamentos de *Fusarium* da secção Liseola) reconhece 6 tipos diferentes de populações (designadas pelas letras A-F). Os isolados de *G. fujikuroi* com membros nos grupos A e F são os únicos dentro do complexo que são

sinônimos de *F. moniliforme*. Os membros dos grupos B e E são classificados como *F. subglutinans* e os membros do grupo D são classificados como *F. proliferatum*. Baseando-se nessa classificação, Leslie et alii (1992) concluíram que a quantidade de fumonisina B1 produzida depende mais do grupo da população a que pertence a cepa do fungo do que da planta hospedeira ou origem geográfica da linhagem.

A produção de FB1 e FB2 por várias espécies de *Fusarium* foi descrita por Thiel et alii (1991b). Os autores verificaram que além do *F. moniliforme*, cepas de *F. proliferatum* e *F. nygamai* também produziram fumonisinas em cultivo. Nelson et alii (1992) testaram a produção de FB1 por outras espécies de *Fusarium* que não *F. moniliforme* da seção Liseola. Os autores constataram que algumas cepas de *F. anthophilum*, *F. dlamini*, *F. napiforme*, *F. proliferatum* e *F. nygamai* podem ser produtoras de fumonisinas. A produção de FB1 por *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* também ocorre (Chen et alii, 1992). Abbas & Ocamb. (1995) relataram a produção de FB1 por *F. polyphialidicum* usando como substrato arroz. Essa espécie de *Fusarium* foi isolada a partir de *Pinus strobus* L.

Alberts et alii (1990) pesquisaram os efeitos de temperatura e de tempo de incubação na produção de FB1 pelo *F. moniliforme* MRC 826. A produção máxima, 17,5 g/kg após incubação a 20°C por 13 semanas, foi obtida usando milho como substrato. Produção essa que não foi significativamente ($P < 0,05$) maior do que a obtida a 25°C por 11 semanas.

A temperatura ótima para produção de FB1 é de 20°C, em culturas de *F. moniliforme* em milho. A produção diminui a medida que a temperatura de incubação afasta-se de 20°C, na seguinte ordem: 20, 25, 15, 30, 10°C. Não houve produção a 5, 35 ou 40°C. A produção máxima de FB1 ocorreu em culturas com 32% de umidade. Porém, quantidades superiores a 200 µg/g foram constatadas após 12 dias de incubação e umidade superior a 27%. Tal teor de umidade coincide com o presente nos grãos por ocasião da colheita. Por outro lado não houve produção de FB1 em culturas desenvolvidas em frascos hermeticamente fechados após 10 semanas. Esses últimos resultados indicam que possivelmente a FB1 não deve ser produzida em atmosferas enriquecidas (silos com atmosferas enriquecidas com N₂ ou CO₂) ou ainda em anaerobiose (Le Bars et alii, 1994).

Cahagnier et alii (1995) demonstraram a influência de diferentes valores de atividade de água (Aa) no desenvolvimento de *F. moniliforme* e produção de fumonisinas realizando experimentos com grãos de milho com diferentes Aa (1; 0,95; 0,90; 0,85). Os níveis de fumonisinas diminuíram três vezes quando a atividade de água foi reduzida em 5%, não havendo contudo qualquer alteração no crescimento fúngico. Uma redução de 10% na atividade de água (de 1 para 0,90) resultou em uma diminuição de 20 vezes no crescimento do fungo, e redução de 300 vezes na produção de

fumonisina. No limiar de 0,85 - 0,86 de Aa, quando o *F. moniliforme* atinge um nível de atividade metabólica não detectável, cessa a produção de fumonisina.

Ross et alii (1990) verificaram altos níveis de fumonisinas produzidos por *F. proliferatum*. Cepas de *Fusarium* isoladas a partir de rações não relacionadas a quadros de intoxicações, produziram fumonisinas em níveis similares àsquelas isoladas a partir de rações que haviam apresentado problemas. Foram observados níveis de FB1 e FB2 na ordem de 960 a 2350 µg/g e 120 a 320 µg/g, respectivamente, para algumas cepas de *F. moniliforme*, e 1670 a 2790 µg/g e 150 a 320 µg/g, respectivamente, para cepas de *F. proliferatum*. A razão FB1/FB2 variou de 5,6 a 14,4 e 8,7 a 11,1 para cepas de *F. moniliforme* e *F. proliferatum*, respectivamente. No entanto, Thiel et alii (1991a), em um estudo que incluiu 10 culturas de *F. moniliforme* isoladas a partir de rações associadas a LEME, registraram concentrações de FB1 e FB2 nas culturas de 160 a 380 e 20 a 950 µg/g, respectivamente.

Ross et alii (1992) testaram o potencial toxigênico de um total de 48 cepas de *F. moniliforme* e *F. proliferatum* isolados de milho e farelo de milho associados com LEME e edema pulmonar em suínos (EPS), cultivados por 28 dias a 25°C. Somente 2 dos 8 isolados de *F. proliferatum* produziram FB1 em quantidades maiores que 300 µg/g. No entanto 12 dos 40 isolados de *F. moniliforme* produziram quantidades maiores que 300 µg/g. A razão FB1/FB2 apresentou uma maior variação que no experimento descrito por Ross et alii (1990). Para *F. proliferatum*, a razão FB1/FB2 variou de 0,05 a 6,8 e para o *F. moniliforme* variou de 3,3 a 70,6. Esses resultados sugerem que as condições de cultivo possuem um papel importante na via biosintética para a produção de fumonisinas.

Ross et alii (1992) relataram o isolamento de *F. moniliforme* e *F. proliferatum* de rações relacionadas e não relacionadas com quadros de LEME ou EPS. As cepas de ambas as espécies de *Fusarium*, cultivadas em milho autoclavado, produziram FB1 e FB2 na ordem de menos de 5 a 2450 µg/g e de menos de 5 a >1000 µg/g, respectivamente. Cepas isoladas de rações, tanto as associadas como as não associadas a micotoxicoses, produziram altos níveis de fumonisina (> 500 µg/g) em cultura.

Holcomb et alii (1993a) inocularam *F. moniliforme* NRRL 13616 em milho, arroz, amendoim, soja e ração para roedores, previamente autoclavados e incubaram a 25°C por 24 dias. As culturas em milho apresentaram 10.242 µg FB1/g e 3068 µg FB2/g, as culturas em arroz apresentaram 206 µg FB1/g e 100 µg FB2/g e as culturas em ração para roedores apresentaram 34 µg FB1/g e 50 µg FB2/g. No entanto, concentrações a níveis de traços (5 µg/g ou menos) de FB1 foram detectadas nas culturas em amendoim e soja.

Sydenham et alii (1993) testaram a capacidade de 12 cepas de *F. moniliforme* e 3 de *F. proliferatum*, de origem argentina, para produzir fumonisinas. Predominância de FB1 foi observada. A produção de FB3, no entanto, foi maior que a produção de FB2. Cabe notar que uma das três culturas de *F. proliferatum* estudadas produziu apenas FB2.

Miller et alii (1993) estudaram a produção de fusarinas e fumonisinas por cepas de *F. moniliforme* provenientes do Sudeste da Ásia, sendo 9 cepas da Indonésia, 7 cepas das Filipinas e 11 cepas da Tailândia. Todas as cepas de *F. moniliforme* testadas produziram fusarina A, C e F e, também, FB1 e FB2. A produção total de fusarinas A, C e F variou de menos que 1 mg/L a 174 mg/L. A produção de FB1 e FB2 variou de 0,5 a 192 mg/L e, tipicamente, a produção de FB2 foi de 7 a 26% de FB1. Correlação entre as quantidades de fusarinas A, C e F e as quantidades de FB1 e FB2 foi notada, com razões entre fumonisinas e fusarinas de cerca de 15:1; 6:1; 1:1, respectivamente. A produção de fumonisinas e fusarinas apresentou diferenças entre as cepas isoladas de milho provenientes da Indonésia, Filipinas e Tailândia

Desjardins et alii (1994) realizaram um levantamento em 4 plantações de milho localizadas no nordeste do México. O estudo teve a finalidade de determinar quais espécies de *Fusarium* presentes nas plantações de milho daquele país, a produção de fumonisinas pelas cepas isoladas e determinar se as cepas isoladas eram geneticamente diferentes. *F. moniliforme*, principalmente *Gibberella fujikuroi* do grupo A, foi a única espécie de *Fusarium* recuperada das sementes de milho nas 4 plantações examinadas. Das 34 cepas, 33 (97%) produziram fumonisinas B1, B2 e B3. Os níveis de concentração de fumonisina total variaram de 10 a 9000 µg/g, sendo superiores que 1000 µg/g em 31 dos 34 extratos

Visconti e Doko (1994) verificaram a produção de FB1 e FB2 por 41 cepas de *Fusarium* isoladas de milho e 17 cepas isoladas de sorgo, trigo, cevada e rações. Todas as cepas de *F. moniliforme* (1 da França, 10 de Itália, 15 da Polônia e 17 da Espanha) e uma linhagem de *F. proliferatum* produziram fumonisinas em quantidades variáveis (0,7 - 4100 µg/g FB1). Essa mesma variabilidade na produção de FB1 foi observada em cepas de *F. moniliforme* isoladas de diferentes substratos provenientes de diferentes zonas geográficas, tais como América do Norte, África, Ásia e Austrália (Leslie et alii, 1992; Nelson et al., 1991; Ross et alii, 1990; Thiel et alii, 1991b). A maior produção de fumonisinas foi fornecida por isolados de milho (média, 1259 µg FB1/g), seguido de trigo (média, 769 µg FB1/g) e cevada (média, 320 µg FB1/g).

Nelson et alii (1991) verificaram a produção de FB1 em culturas de *F. moniliforme*, isoladas de vários substratos provenientes de diferentes localizações geográficas e cultivadas em milho por

30 dias a 25°C. A produção da toxina variou de < 1 µg/g a > 6000 µg/g. Ainda Nelson et alii (1994) constataram que, em substratos sólidos, cepas de *F. moniliforme* produziram FB1 em maior quantidade, enquanto que algumas cepas de *F. proliferatum* produziram FB2 e/ou FB3 em maiores concentrações que FB1.

Yoshizawa et alii (1994) observaram que as cepas de *Fusarium* isoladas do milho provenientes da região de Lixian, na China, produziram FB1 em níveis variando de 1280 a 11300 µg/g.

Bottalico et alii (1995) examinaram 13 cepas de *F. moniliforme* isoladas a partir de grãos de milho provenientes de espigas coletadas na Sardenha, Itália, as quais apresentavam uma sintomatologia denominada de podridão da espiga. Estas cepas foram cultivadas em grãos de milho autoclavado, por 4 semanas a 25°C, e todas produziram FB1 até 3750 µg/g. Quatro cepas de *F. proliferatum* também produziram altas concentrações de FB1 atingindo níveis de até 2500 µg/g.

2.4. Controle de fumoninas no campo e na estocagem

O *F. moniliforme* é um contaminante muito comum em grãos de cereais, portanto as medidas de controle parecem ser difíceis. O controle desse patógeno no campo deve levar em conta o seu complexo ciclo de infecção e também os mecanismos potenciais de desenvolvimento de resistência ao *F. moniliforme* no milho. A expressão da infecção é muito variável, provavelmente por causa da heterozigose encontrada dentro dos cultivares de milho e por causa da variação genética dentro das espécies de fungos. Diversos aspectos da infecção parecem estar sob controle genético (De Leon & Pandey, 1989) e a genética do pericarpo é considerada um fator determinante na resistência à transmissão do fungo para o grão através do ar e insetos (Scott & King, 1984). Portanto o tipo de cultivar de milho é um fator importante na prevenção da entrada do fungo na cadeia alimentar. Possivelmente o controle da contaminação através do solo e infecção de grãos pode ser conseguido com o uso de microrganismos, particularmente bactérias do solo e endofíticas (Bacon & Williamson, 1992). Naturalmente o sucesso da utilização de medidas de biocontrole deve fundamentar - se em conhecimento detalhado do *F. moniliforme* e sua associação com o milho, informação ainda não disponível (Rilley et alii, 1993).

No controle pós-colheita, dois fatores são importantes: a aeração e o teor de umidade. A produção de fumonisinas é mínima em condições de baixa pressão de oxigênio. Portanto a estocagem sob atmosfera modificada (por ex., N₂ ou CO₂) deverá reduzir ou prevenir a produção de toxinas. O mesmo espera-se quando o teor de umidade dos grãos for baixo (< 22%) (Le Bars et alii,

1994). Conforme Rommer & Maune (1993), durante a estocagem, a umidade dos grãos deveria ser mantida abaixo de 14% para minimizar crescimento fúngico adicional.

Pouco se sabe sobre os fatores que contribuem para a produção de fumonisinas no campo. King & Scott (1981) demonstraram que os genótipos de milho diferem significativamente quanto ao percentual de grãos aparentemente saudáveis que estão contaminados com *F. moniliforme* e que essas diferenças estão sob controle genético. Shelby (1994) trabalhou com 15 híbridos de milho disponíveis comercialmente plantados em 17 localidades nos EUA. A média de produção de fumonisinas em todos os híbridos, nos diversos locais, variou de 0,5 a 48,5 µg/g. Em geral, a produção de fumonisinas aumentou com a diminuição da latitude. Em todos os locais, existiram efeitos e interações significativas no que se refere aos fatores localização versus híbrido. Shelby (1994), baseando-se na produção de fumonisinas por híbridos comerciais, sugeriu a seleção de híbridos resistentes para áreas onde fumonisinas em milho constituem um problema.

2.5. Descontaminação

A ocorrência de fumonisinas em alimentos e rações indica a necessidade do desenvolvimento de métodos de detoxificação que possibilitem o aproveitamento de grãos contaminados. Até o presente, vários estudos enfocaram o efeito do processamento térmico sobre o conteúdo de fumonisinas em alimentos. A fervura de extratos de culturas de *Fusarium moniliforme* em milho, por 30 minutos, não reduziu o teor de fumonisina nesse material e também não reduziu o seu potencial tóxico (Alberts et alii, 1990). A pasteurização (aquecimento a 62°C por 30 minutos) de leite contaminado artificialmente com FB1 e FB2, não reduziu o teor de fumonisinas (Maragos & Richard, 1994). Dupuy et alii (1993) e Le Bars et alii (1994) estudaram a estabilidade térmica da FB1, produzida por culturas de cepas toxigênicas de *F. moniliforme* em milho seco, e verificaram que a decomposição térmica seguiu uma reação de primeira ordem. O cálculo da meia-vida, tempo em que a concentração da FB1 é reduzida à metade, indicou meias-vidas de 10, 38, 175 min e 2 horas para temperaturas de 150, 125, 100 e 75°C, respectivamente. Baseando-se nesses dados, concluíram os autores que muito provavelmente a FB1 é uma micotoxina relativamente estável durante secagem e processamento do milho. O estudo da termoestabilidade da FB1 e da FB2, em alimentos a base de milho, revelou perdas de 60% quando o produto seco foi aquecido a 190°C. Quando o produto umidificado foi aquecido a 190°C, 70 a 80% das toxinas não foram recuperadas. Ocorreu ainda perda completa sob tratamento térmico a 220°C. De maneira semelhante, o conteúdo de fumonisinas foi parcialmente reduzido em biscoitos de farinha de milho cozidos a 220°C por 25 minutos (Scott & Lawrence, 1994). Estudos de Bordson et alii (1995) e Scott & Lawrence (1994) indicaram que as perdas observadas no teor de fumonisinas em alimentos processados podem ser

devido a dificuldades de recuperação e detecção relacionadas com a matriz. Jackson et alii (1996) estudaram os efeitos do tempo de processamento e temperatura sobre a estabilidade da FB1 em soluções aquosas a pH 4, 7 e 10. Constataram a presença de produtos de hidrólise da FB1 e concluíram que pode haver uma redução considerável nos níveis de FB1 em alimentos submetidos a temperaturas superiores a 150°C durante o processamento.

Alguns outros estudos investigaram o efeito do tratamento de milho contaminado com fumonisinas com compostos básicos. Norred et alii (1991^a) expressaram dúvidas quanto à eficiência do tratamento em atmosfera amoniacal. O emprego de amônia a alta pressão (60 psi) e baixa temperatura (20°C) resultou em redução de 79% nos níveis detectados de FB1 em milho. Contudo, o potencial tóxico dos produtos de reação não foi determinado (Park et alii, 1992). Hendrich et alii (1993), por sua vez, concluíram não existiam indicações seguras de que nixtamilização (tratamento tradicional do milho com Ca(OH)_2 e aquecimento, usado para preparar a farinha para tortilha em países centro-americanos) fosse uma estratégia eficiente para detoxificação do milho contaminado com fungos produtores de fumonisinas. Realmente, Sydenham et alii (1991) verificaram que produtos a base de milho tratados com Ca(OH)_2 durante o processamento, apresentaram baixas quantidades de fumonisinas. No entanto, mais tarde Sydenham et alii (1995) verificaram que o tratamento básico provoca hidrólise alcalina da FB1 produzindo o aminopentol (AP1) e o ácido tricarbálico.

Bothast et alii (1992) observaram que etanol resultante da fermentação de milho mofado não apresentava fumonisinas. No entanto, a cerveja obtida de milho mofado continha quantidades apreciáveis de fumonisinas. Canela et alii (1996) constataram a diminuição do conteúdo de fumonisinas nos grãos de milho submetidos à primeira etapa da moagem úmida e sugeriram que a contaminação da água de imersão do milho com fumonisinas deve ser considerada quando o milho é usado como matéria prima na indústria de ração ou quando o milho picado é utilizado durante a fermentação da cerveja.

Sydenham et alii (1994) testaram a remoção de partículas menores que 3 mm de carregamentos de milho antes do processamento como um possível método de descontaminação. Os autores obtiveram uma redução no conteúdo total de fumonisinas entre 26,2 a 68,4%. Em outro trabalho, Sydenham et alii (1995) apresentaram evidências adicionais de que as fumonisinas estão associadas com as camadas exteriores dos grãos de milho naturalmente contaminados e sugeriram que a remoção do pericarpo possa ser empregada para a redução dos níveis de fumonisinas em milho.

Rommer & Maune (1993) informaram que não existem restrições legais nos E.U.A com relação à mistura de grãos contaminados com micotoxinas (exceto no que se refere a aflatoxinas) com lotes não contaminados para redução do teor total da toxina podendo, portanto, esta via ser empregada naquele país.

Um novo enfoque que parece promissor foi iniciado por Murphy et alii (1996) e Lu et alii (1997), os quais estudaram a reação do grupo amina da FB1 com açúcares redutores (glicose ou frutose) para produzir bases de Schiff, produtos estes que não são tóxicos.

2.6. Efeitos tóxicos

2.6.1. Mecanismo de ação das fumonisinas

Wang et alii (1991) propuseram um possível mecanismo de ação para os efeitos biológicos das fumonisinas. Esses autores sugeriram que a FB1 pode interferir na biosíntese dos esfingolípídios ou no equilíbrio do nível de esfingosina devido a similaridade entre a porção álcool polihídrica da FB1 e a estrutura amino álcool da esfingosina (Figura 4).

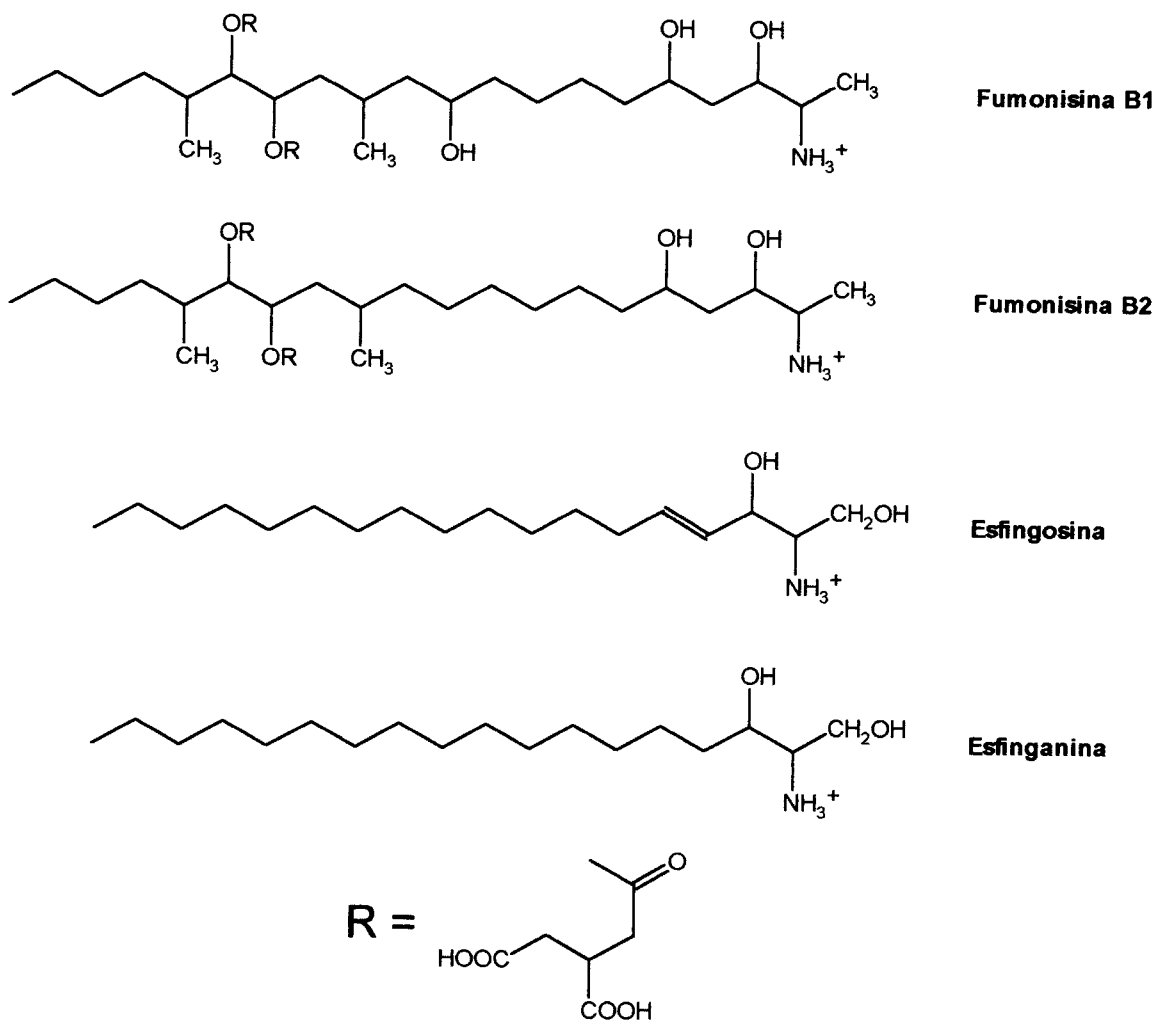
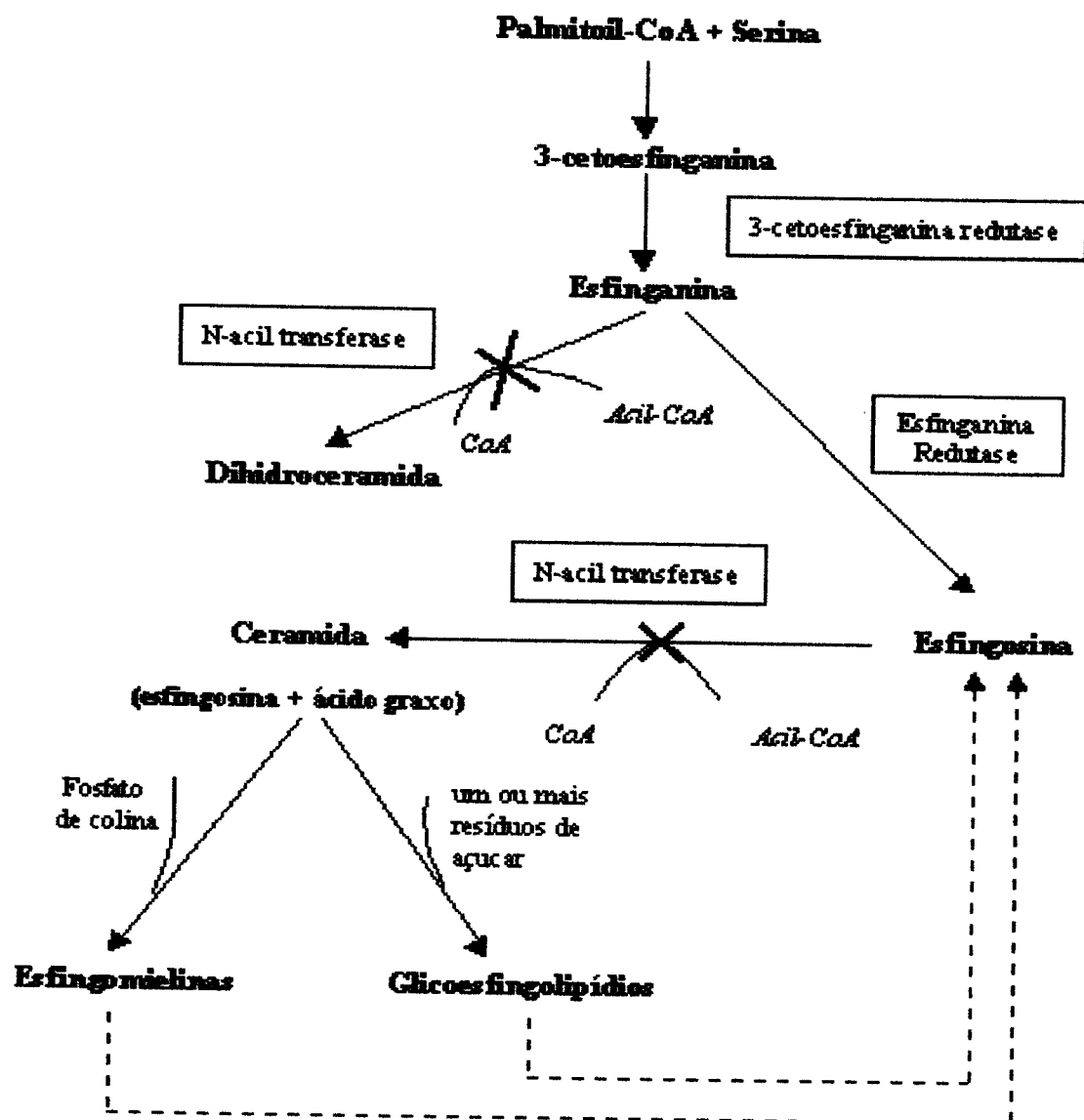


Figura 4. Comparação das estruturas de fumonisina B1 e B2 , esfingosina e esfinganina

A esfingosina constitui o esqueleto dos esfingolipídios (esfingomielinas e glicoesfingolipídios). As esfingomielinas (fosfoesfingolipídios) contêm um ácido graxo, fosfato, colina e esfingosina. Os glicoesfingolipídios são formados pela ceramida (combinação de esfingosina e ácido graxo) com um ou mais resíduos de açúcar. Os esfingolipídios são importantes para a integridade da membrana celular, comunicação e contato intercelular. Os esfingolipídios são encontrados em grandes quantidades no cérebro e tecido nervoso. Por exemplo, o glicoesfingolipídio galactosil-ceramida é o maior constituinte da membrana dos oligodendrocitos e células de Schwann no sistema nervoso central e periférico, respectivamente. A esfingosina é sintetizada no retículo endoplasmático. A combinação de palmitoil-CoA e o aminoácido serina forma a 3-ceto esfinganina que é reduzida à esfinganina e esta é reduzida à esfingosina. A ceramida é formada pela combinação de ácido graxo livre ou acil-CoA e esfingosina. A esfingomielina é formada quando a ceramida reage com a citosina difosfato colina ou fosfatidilcolina. (Merrill, Jr, 1991) (Figura 5).

Para testar a hipótese de que as fumonisinas agem pela alteração da biosíntese de esfingolipídios, Wang et alii (1991) examinaram o efeito da FB1 na conversão de [14C]-serina a esfingolipídios marcados por hepatócitos de ratos. Constataram que a FB1 inibia a biossíntese *de novo* de esfingolipídios. Um grau similar de inibição foi obtido com FB2. Assim, concluíram os autores que as fumonisinas parecem ter ação inibitória na biosíntese de esfingolipídios e em concentrações que podem ser alcançadas ou ultrapassadas pelo consumo de milho naturalmente contaminado.

O sítio específico de ação da FB1 parece ser as enzimas esfinganina- e esfingosina-N-acil-transferases (Figura 5). A inibição dessa via metabólica resulta na diminuição de esfingolipídios, aumentando a concentração intracelular de esfinganina livre (e em menor extensão esfingosina livre) e dos produtos de degradação. Contudo, não está evidente se níveis elevados de bases esfingoides livres são responsáveis pela toxicidade em animais ou se outras consequências da ruptura do metabolismo dos esfingóides são mais importantes para determinar os efeitos tóxicos.



X : vias metabólicas consideradas serem bloqueadas pelas fumonisinas

Figura 5. Mecanismo de inibição da biosíntese de esfingolipídios pelas fumonisinas

O fundamento estrutural da inibição da esfinganina (esfingosina) N-acil-transferase é desconhecido. Tem sido postulado (Wang et alii, 1992) que a similaridade entre as fumonisinas e a cadeia longa básica esfingóide permite que as fumonisinas sejam reconhecidas como substratos pela esfingosina ou esfinganina-N-acil-transferase. Merrill et alii (1993) demonstraram que a FB1 inibiu a esfinganina N-acil-transferase em microsomas de cérebro de camundongo, apresentando comportamento cinético competitivo semelhante tanto com relação a esfinganina como a estearoil CoA. A FB1 também inibiu a biosíntese de esfingolipídios em culturas de neurônios cerebrais *in situ*, o que refletiu no acúmulo de esfinganinas livres e redução em massa dos esfingolipídios totais. A inibição da síntese de esfingolipídios foi reversível e níveis próximos dos normais foram observados 48 horas após a remoção da toxina.

O acúmulo de bases esfingóides de cadeia longa livres (esfingosina e esfinganina) e a diminuição de esfingolipídios poderiam explicar pelo menos alguns dos efeitos patológicos das fumonisinas. A degeneração das células neuronais observadas na neurotoxicidade associada a LEME pode ser devido a inibição da biosíntese de esfingolipídios, pois o cérebro contém altos níveis de esfingolipídios (Merrill, Jr, 1991). O acúmulo de esfinganina em células expostas a fumonisinas podem levar a morte celular (as bases de cadeias longas são altamente citotóxicas *per se*) ou proliferação celular (esses compostos são mitogênicos para alguns tipos de células (Wang et alii, 1991). Schroeder et alii (1994) usando um ensaio *in vitro* com fibroblastos de camundongos, demonstraram que FB1 é mitogênica devido prioritariamente ao acúmulo de bases esfingóides e não tanto pela inibição da biossíntese dos esfingolipídios. Contudo, FB1 e FB2 inibiram a proliferação celular e se apresentaram citotóxicas em células de epitélio renal *in vitro* (Yoo et alii, 1992).

A alteração do metabolismo dos esfingolipídios provocado pelas fumonisinas pode ser monitorado pela medida dos níveis sorológicos de esfingosina, esfinganina e esfingolipídios. Wang et alii (1992) mediram esses parâmetros em pôneis submetidos a uma dieta contendo 44 mg FB1/kg. Ambas, a esfinganina e a esfingosina, e especialmente sua relação, aumentaram após exposição a fumonisina, enquanto que os níveis sorológicos dos esfingolipídios diminuíram. A relação entre esfinganina livre: esfingosina livre no soro também aumentou em suínos e aves expostos a fumonisinas (Riley et alii, 1992; Weibking et alii, 1993a). Como a alteração na relação entre esfinganina:esfingosina foi observada antes da elevação de enzimas hepáticas no soro, a determinação dessa relação tem sido proposta como um indicador prévio de toxicidade por fumonisina.

2.6.2. Toxicidade das fumonisinas em animais

O consumo de ração contaminada com fumonisina tem sido associado com doenças de ocorrência natural, tais como, leucoencefalomalácia eqüina (LEME) e edema pulmonar em suínos (EPS). Não existem registros de surtos naturais de toxicose produzida por fumonisinas em outras espécies animais.

De acordo com Hansen (1993) um grupo de trabalho formado pelo "Food Drug Administration" e pelo "United States Department of Agriculture" recomendou níveis máximos de fumonisinas de 5 µg/g para equídeos, 10 µg/g para suínos e 50 µg/g para bovinos.

Leucoencefalomalácia eqüina

A leucoencefalomalácia eqüina (LEME) é uma doença não infecciosa, esporádica e altamente fatal que afeta o sistema nervoso central de cavalos e outros eqüídeos. Ocorre em diferentes partes do mundo. Existem registros dessa doença nos Estados Unidos desde 1859 (Wilson et alii, 1973).

Até o presente, foram registrados dois tipos diferentes de síndromes de LEME. A manifestação mais freqüentemente registrada afeta o sistema nervoso central e constitui-se na forma neurotóxica da LEME. Essa forma da doença é altamente fatal e pode ser antecedida por um período curto de letargia e anorexia, ocorrendo morte aguda sem o aparecimento de sinais clínicos prévios. A mortalidade é de geralmente 25% podendo chegar a 100%. Os sobreviventes apresentam usualmente lesões neurológicas permanentes. A LEME é caracterizada por necrose liquefativa da matéria branca do hemisfério cerebral (Marasas et alii, 1988; Wilson et alii, 1992). A LEME hepatotóxica é a outra forma clínico-patológica da doença. Assim como a forma neurotóxica, é caracterizada inicialmente por inapetência e depressão, seguida de edema facial e icterícia, indicando lesões hepáticas severas (Marasas et alii, 1988; Wilson et alii, 1990; Wilson et alii, 1992).

A LEME foi reproduzida experimentalmente em eqüídeos com cultura de *F. moniliforme* Sheldon (Marasas et alii, 1976), e através do composto puro, FB1, isolado de culturas desse mesmo fungo (Marasas et alii, 1988). A FB1 induz leucoencefalomalácia em cavalos quando aplicada 7 vezes consecutivas, por via intravenosa, na dose de 125 mg/Kg de peso corporal/dia (Marasas et alii, 1988) ou, 16 vezes, na dose de 0,1 mg/kg de peso corporal/dia (Laurent et alii, 1989). Por via oral, a dose total de 44,3 mg de FB1 (95% de pureza)/kg de peso corporal/29 dias provocou leucoencefalomalácia em cavalos jovens (Kellerman et alii, 1990). Porém, em outro estudo, uma dose total de 32,6 mg/kg de peso corporal/26 dias em éguas não provocou leucoencefalomalácia (Laurent et alii, 1989).

É interessante observar que a reprodução experimental de LEME usando FB1 purificada produz a síndrome neurotóxica. No entanto, o resultado não é tão evidente quando se usa material de cultura de *F. moniliforme* ou milho ou farelo de milho naturalmente contaminado como fonte de fumonisinas. Isso leva a crer que esses materiais contêm outros metabólitos produzidos pelo *Fusarium*. A função, desses outros metabólitos produzidos pelo *Fusarium*, na etiologia da LEME hepatotóxica, ainda não está demonstrada (Diaz & Boermans, 1994).

Edema pulmonar em suínos

Edema pulmonar em suínos caracteriza-se por edema pulmonar e hidrotórax severo. Essa doença foi associada ao consumo de rações, a base de milho, contaminadas com *Fusarium* e foi particularmente observada em suínos que consumiram milho e farelo de milho originários da colheita de 1989, nos Estados Unidos (Osweiler et alii, 1992).

Edema pulmonar foi induzido em suínos com injeções intravenosas de FB1 e ingestão de milho naturalmente contaminado com FB1 e FB2. Uma dose total de 11,3 mg (0,4 mg/kg de peso corporal/dia) foi suficiente para causar a doença em um suíno (Colvin & Harrison, 1992; Harrison et alii, 1990). Em um outro estudo (Haschek et alii, 1992), com doses mais altas (totalizando 72 mg e 67 mg de FB1) somente foi observado edema pulmonar intersticial em um suíno dos dois testados. Haschek et alii (1992) observaram lesões hepáticas e pancreáticas em suínos testados.

A teoria descrita a seguir tenta explicar o edema pulmonar em suínos (EPS). O metabolismo dos esfingolípídios é alterado causando necrose hepatocelular, o que provoca liberação de material membranoso na circulação. Esse material é fagocitado pelos macrófagos intravasculares pulmonares que estão presentes em grande número no pulmão de suínos, e aciona a liberação de mediadores inflamatórios, que finalmente completam o quadro clínico de edema pulmonar (Haschek et alii, 1992). Os órgãos alvo das fumonisinas em suínos são o pulmão, o fígado e o pâncreas. Duas síndromes distintas podem ocorrer. Com doses baixas, o progresso da doença no fígado é lento, enquanto que com doses altas, um edema pulmonar agudo é sobreposto ao dano hepático, levando à morte (Haschek et alii, 1992).

Toxicose produzida por fumonisina em aves

Os estudos sobre o efeito tóxico das fumonisinas em aves tem sido conduzidos usando extratos aquosos de culturas de *F. moniliforme* como fonte de fumonisinas. Nesses estudos rações não contaminadas são misturadas com culturas de *F. moniliforme* contendo quantidades conhecidas de fumonisinas a fim de conseguir a concentração desejada de fumonisina na dieta (Weibking et alii, 1993a, 1993b). A concentração média de FB1 em culturas de *F. moniliforme* é geralmente muito baixa, aproximadamente 2 mg/g (0,2%). Portanto, a fim de se conseguir a concentração desejada, quantidades significativas de extrato de cultura são adicionadas, e em muitos casos constituem mais do que 10% da dieta experimental (Weibking et alii, 1993a). Sendo a concentração de FB1 no extrato de cultura geralmente em torno de 0,2%, existe uma grande porção do extrato de cultura (99,8%) que pode ser fonte de metabólitos de *Fusarium* desconhecidos, os

quais, por sua vez, podem ser responsáveis por resultados confusos em um experimento deste tipo (Diaz & Boermans, 1994).

Norred et alii, (1991b) observaram a presença de metabólitos solúveis em água, citotóxicos, ainda não identificados, em culturas de *F. moniliforme*. Esses compostos podem ter um papel importante na grande variedade de sinais clínicos e lesões observadas em aves submetidas a dietas contendo extratos de culturas. Além disso, os estudos sobre efeitos tóxicos de fumonisinas em aves usaram níveis relativamente altos na dieta (75-525 mg/kg). O nível usual de FB1 no milho é da ordem de 0 a 5 mg/Kg (Rottinghaus et alii, 1992; Holcomb et alii, 1993a; Pittet et alii, 1992; Murphy et alii, 1993) e o milho normalmente contaminado é adicionado na proporção de 50% na ração para aves, o que resulta em um nível máximo de 2,5 mg FB1/Kg nas rações para aves. Em um estudo desenvolvido por Pittet et alii (1992), somente 6 dentre 22 amostras de rações para aves foram positivas para FB1 e 2 das 22 continham níveis detectáveis de FB2. Os valores variaram de 0 a 0,48 µg/g de FB1 (média de 0,235 µg/g nas amostras positivas). Portanto, é questionável o significado prático de estudos usando níveis de FB1 que são extremamente improváveis de serem encontrados em milho naturalmente contaminado (Diaz & Boermans, 1994).

Experimentos utilizando FB1 purificada em concentrações de 125 e 274 mg/kg na dieta de frangos provocou redução de ganho de peso, mortalidade e lesões em vários órgãos desses animais, tais como fígado, rim, coração e pulmão (Javed et alii, 1993a). Mudanças patológicas e morte em embriões de aves também foram observadas (Javed et alii, 1993b).

Toxicose produzida por fumonisina em bovinos

Osweiler et alii (1993) avaliaram os efeitos do farelo de milho contaminado com fumonisina no crescimento e saúde de bovinos. Dezoito bovinos foram submetidos à dieta contendo 15, 31 ou 148 mg de fumonisinas por quilo de peso corporal por 31 dias. Nenhum efeito relacionado ao tratamento foi observado na ingestão de ração ou ganho de peso. No entanto, aumentos significativos de lactato desidrogenase, bilirrubina e colesterol no soro foram observados a partir do 10º até ao 31º dia. Em dois bovinos que receberam níveis mais altos de fumonisinas, foram observadas lesões hepáticas leves, incluindo degeneração leve do hidropico piriacinar e aumento de volume dos hepatócitos. A blastogênese linfocitária diminuiu significativamente no final do período do tratamento no grupo submetido a doses mais altas, mas outras medidas da função imunológica não foram afetadas significativamente. Os autores concluíram que a ingestão de fumonisinas em níveis considerados tóxicos para suínos e eqüinos provocam mudanças suaves na função hepática e imunológica de bovinos.

Toxicose produzida por fumonisina em outros animais

Alguns trabalhos relatando os efeitos tóxicos em outros animais podem ser encontrados na literatura mais recente. Bucci et alii (1996) observaram 5 coelhas prenhes que receberam por entubação 1,75 mg FB1/kg p.c. por dia e constaram 2 mortes após 9 e 13 dias, respectivamente. Ambos os animais apresentaram lesões cerebrais. Em um dos animais foi caracterizada leucoencefalomalacia moderada e hemorragias focais múltiplas. O segundo animal apresentou diminutas hemorragias no hipocampo.

Efeitos tóxicos sub-crônicos causados por FB1 e por milho contaminado com *F. moniliforme* em ratos e camundongos foram relatados por Voss et alii (1996). Os autores encontraram que o órgão alvo para ambas as espécies foi o fígado sendo que no caso dos ratos também os rins foram afetados. O nível de ingestão em que nenhum efeito pode ser observado, foi consistentemente mais baixo em ratos machos que em fêmeas.

Bondy et alii (1997) submeteram seis grupos de 14 camundongos machos e fêmeas a 14 doses diárias de 1 a 75 mg FB1/kg p.c., por entubação. Os autores não encontraram respostas consistentes com relação ao sexo do animal. Observaram modificações no fígado, nos rins, e na medula mas, concluíram não serem os ratos uma espécie suficientemente sensível à FB1 para constituir-se um modelo adequado para estudo de intoxicações por esta toxina

Em um trabalho relativamente mais antigo e pioneiro, Gelderblom et alii (1991) expuseram 25 ratos à FB1 através da alimentação por um período de 6, 12, 20 e 26 meses. Os resultados apontaram o fígado como o órgão alvo da toxina. Dos 15 ratos sacrificados entre 18 e 26 meses, 10 haviam desenvolvido hepatocarcinomas primários e foram constatadas metástases no coração, nos pulmões ou nos rins em 4 dos ratos. Nefrite crônica intersticial foi encontrada nos animais abatidos após 26 meses.

6.3. Carcinogenicidade das fumonisinas - Câncer de esôfago em humanos

Em algumas regiões do mundo, a incidência de câncer de esôfago é muito acima da incidência normal de 5 ou menos casos em 100.000 pessoas. Transkei, na África do Sul, a região mais estudada com relação a esse assunto, possui incidência de câncer de esôfago de 50-200 por 100.000 habitantes (van Rensburg, 1985). Também Linxian, na China, tem apresentado alta incidência de câncer de esôfago, com 100-150 casos em 100.000 habitantes (Yang, 1980). Existem estudos que mostram forte correlação epidemiológica entre o câncer de esôfago e a ocorrência de *F.*

moniliforme no milho e produtos a base de milho no sul da África e no norte da China (Marasas et alii, 1979; 1988b; Cheng et alii, 1985).

A população na região de Transkei consome milho como produto básico da alimentação, incluindo um tipo de cerveja e uma bebida fermentada não-alcoólica feitas com milho. O milho utilizado é plantado e colhido localmente, e é estocado em caixas abertas, apresentando-se visivelmente mofado. As espigas mais mofadas são manualmente selecionadas para serem utilizadas na preparação de cerveja e o ***F. moniliforme*** é o fungo predominante (Marasas et alii, 1979; 1988b).

A contaminação do milho com ***F. moniliforme*** (Marasas et alii, 1988b; Rheeder et alii, 1992) e fumonisinas (Sydenham et alii, 1990b) nas áreas de alta incidência de câncer de esôfago foi estatisticamente mais alta do que a encontrada em áreas de Transkei com baixa incidência de câncer de esôfago (Marasas et alii, 1988b; Rheeder et alii, 1992). A fumonisina B1 tem sido apresentada como substância com potencial carcinogênico em ratos de laboratório (Gelderblom et alii, 1991). Em outras regiões do mundo existem altas incidências de câncer de esôfago, e se especula sobre a associação com a incidência do ***F. moniliforme*** e/ou fumonisinas (Chu & Li, 1994; Yoshizawa et alii, 1994).

A fumonisina B1 não é considerada um carcinógeno completo, mas parece atuar como um potente promotor de tumores (Gelderblom et alii, 1988, 1991) e, em ao menos um estudo, foi demonstrado que a FB1 possui atividade iniciadora de câncer (Gelderblom et alii, 1992). A FB1 está classificada como carcinógeno "2B", pela agência internacional de pesquisa sobre o câncer (IARC, 1993), significando que existem suficientes evidências de carcinogenicidade no que se refere a testes em animais, mas os dados em humanos são inadequados.

Embora a FB1 seja um carcinógeno, como referido acima, ela não é genotóxica, pois ela não induz a síntese de DNA alterado em hepatócitos de ratos (Norred et alii, 1992a). Também não é mutagênica em ensaio de mutagenicidade com ***Samonella*** (Gelderblom & Snyman, 1991; Park et alii, 1992). No entanto, as fumonisinas são tóxicas para muitos tipos de culturas de células de mamíferos (Norred et alii, 1992b; Shier et alii, 1991; YOO et alii, 1992). Também são tóxicas a macrófagos de galinhas (Qureshi & Hagler, 1992). A fumonisina B2 apresentou-se, em alguns casos, mais citotóxica que a FB1 (Shier et alii, 1991).

2.6.4. Fitotoxicidade das fumonisinas

FB1 e FB2, como as toxinas AAL, são fitotóxicas. A FB1 provoca danos em uma série de ervas daninhas e cereais, incluindo *Lemma minor* L. (Vesonder et alii, 1992), *Datura stramonium* L. (Abbas et alii, 1991; Abbas & Boyette, 1992), tomate (Gilchrist et alii, 1992; Mirocha et alii 1992b), soja (Abbas & Boyette, 1992), plântulas de milho (Doehlert et alii, 1994).

No milho, o fungo ataca porções em desenvolvimento da planta e, geralmente, a infecção é assintomática, dependendo da natureza genética do fungo, do cultivar de milho e de fatores ambientais. As doenças causadas no milho são: podridão do colmo, podridão da raiz e podridão da espiga. É através das infecções assintomáticas que as toxinas produzidas pelo *Fusarium moniliforme* podem entrar na cadeia alimentar animal e humana (Bacon & Williamson, 1992).

2.7. Ocorrência de fumonisinas

2.7.1. Níveis de fumonisinas em rações animais associadas a micotoxicoses em animais

Wilson et alii (1990) correlacionaram pela primeira vez a LEME com a ocorrência de fumonisinas em milho mofado. Três amostras de milho provenientes de uma fazenda no Arizona, EUA, onde ocorreram 14 casos fatais em 18 cavalos, apresentaram concentrações de FB1 na ordem de 37 a 122 µg/g, sendo também detectada a FB2.

Plattner et alii (1990) verificaram a ocorrência de FB1 em concentrações de 20 µg/g em duas amostras de milho associadas a casos de LEME.

Ross et alii (1991b) determinaram FB1 em 38 amostras de rações associadas com 44 casos de LEME e 83 amostras de rações associadas com 42 casos de EPS. As concentrações de FB1 variaram de 1 a 126 µg/g e 75% dos casos apresentaram pelo menos uma amostra acima de 10 µg/g nas rações associadas a LEME. Nas rações associadas a EPS, as concentrações de FB1 variaram de 1 µg/g a 330 µg/g, sendo que em 71% dos casos havia pelo menos uma amostra acima de 100 µg/g.

Sydenham et alii (1992a) determinaram FB1, FB2 e FB3 em amostras de rações associadas com casos de LEME nos EUA no período de 1983 -1986, registrando pela primeira vez a ocorrência natural de FB3. Os níveis encontrados para FB3 variaram de 0 a 2,65 µg/g e foram

consideravelmente menores que os níveis de FB1 (1,30-16,80 µg/g) e FB2 (0,10-6,50 µg/g) registrados por Thiel et alii (1991a). Em 12 das amostras a FB3 apareceu em níveis correspondentes a 2,2 -18% da concentração de fumonisina total, alertando para o fato que amostras com histórico de LEME devem ser analisadas para a detecção de FB1, FB2 e FB3.

Ross et alii (1992) verificaram a ocorrência de FB1 em rações associadas a casos de LEME e EPS que ocorreram durante a safra de 1989. A análise química de rações suspeitas de causar EPS apresentavam concentrações de FB1 variando de 20 a 360 µg/g e as rações suspeitas de causar LEME apresentaram concentrações de FB1 variando de 8 a 117 µg/g. Rações que não causaram problemas de LEME ou EPS apresentaram concentrações de FB1 abaixo de 8 µg/g.

Binkerd et alii (1993) analisaram 291 amostras de milho ou ração com suspeitas de provocarem micotoxicoses. Aproximadamente 67% das amostras continham menos que 5 µg/g de FB1. Por outro lado, quase 84% (83,5%) das amostras continham menos que 10 µg/g de FB1 e 16,5% das amostras apresentavam mais do que 10 µg/g de FB1.

Sydenham et alii (1993) relataram sobre a ocorrência de FB1, FB2 e FB3 em milho proveniente da Argentina e sobre a produção de fumonisinas por cepas de *Fusarium* isoladas também de milho argentino. Em 17 amostras as concentrações de fumonisinas variaram de 1585 a 9990 ng/g. Níveis de fumonisinas acima de 2000 ng/g foram constatados em 16 das 17 amostras. Várias dessas amostras estavam associadas a casos de LEME.

2.7.2. Níveis de fumonisinas em milho e produtos de milho destinado ao consumo humano

A primeira publicação conclusiva sobre a ocorrência de FB1 em milho foi feita por Sydenham et alii (1990a). Milho mofado, de cultivo doméstico, foi coletado em uma região de Transkei, África do Sul, em uma zona de alta incidência de câncer de esôfago. Altos níveis de fumonisinas foram encontrados e uma amostra chegou a apresentar 44 µg FB1/g. Amostras não visivelmente mofadas apresentaram < 10 µg FB1/g, mas uma amostra de milho infectado com *Fusarium* apresentou 83 µg FB1/g.

Sydenham et alii (1990b) observaram que amostras de milho normal, provenientes de zona com alta incidência de câncer de esôfago, apresentavam concentrações de FB1 e FB2 cerca de 20 vezes maior do que amostras de milho normal provenientes de zonas de baixa incidência de câncer de esôfago. Foram detectadas FB1 e FB2 em todas as amostras analisadas. Para FB1 os níveis

encontrados estavam entre 0,45 e 18,9 e para FB2 entre 0,15 e 6,75 $\mu\text{g/g}$, em amostras provenientes de áreas de baixa incidência de câncer de esôfago. Já nas áreas de alta incidência deste tipo de câncer, os níveis de FB1 estavam entre 3,45 e 46,9 e para FB2, entre 0,9 e 16,3 $\mu\text{g/g}$.

Yoshizawa et alii (1994) verificaram a ocorrência de FB1 e FB2 em 47 amostras de milho coletadas em 1989 nas regiões de Lixian e Shangqiu na Província Henan, República da China, áreas de alto e baixo risco, respectivamente, para câncer de esôfago. A contaminação média no milho de Linxian foi de 0,872 $\mu\text{g/g}$ FB1 (faixa de 0,186 - 2,964) e de 0,448 $\mu\text{g/g}$ FB2 (faixa de 0,298 - 0,550). Por outro lado, o milho de Shangqiu apresentou uma concentração média de 0,890 $\mu\text{g/g}$ FB1 (faixa de 0,197 - 1,732) e de 0,330 $\mu\text{g/g}$ FB2 (faixa de 0,213 - 0,447). A incidência de contaminação por fumonisina no milho de Linxian (48%) foi aproximadamente 2 vezes maior que no do milho da região de Shangqiu (25%) e o milho da região de alto risco (Linxian) foi o que mais frequentemente apresentou co-contaminação com tricotecenos.

Fumonisinas foram analisadas em produtos comerciais a base de milho em um total de 124 amostras provenientes de 5 países (Canadá, Egito, Peru, África do Sul, Estados Unidos) (Sydenham et alii, 1991). Os resultados indicaram, pela primeira vez, que consumidores de alimentos à base de milho nos Estados Unidos e na África do Sul estão expostos a elevados níveis de fumonisinas. De 81 amostras de produtos de milho disponíveis comercialmente na África do Sul, 60% continham menos que 0,100 $\mu\text{g/g}$ de fumonisinas totais e nenhuma amostra continha mais que 0,600 $\mu\text{g/g}$. Nas 35 amostras dos EUA, somente 48,6% apresentaram fumonisinas totais abaixo de 0,500 $\mu\text{g/g}$, e 26,8% continha mais do que 1,000 $\mu\text{g/g}$. Sydenham et alii (1991) encontraram FB1 variando de 0-2,790 $\mu\text{g/g}$ e FB2 variando de 0-0,920 $\mu\text{g/g}$ (Tabela 1).

Tabela 1. Níveis de fumonisinas em alimentos a base de milho para humanos

Região	Número de amostras	Níveis de fumonisinas ($\mu\text{g/g}$)	
		FB1	FB2
Canadá	2	0,05	0
Egito	2	1,8-3,0	0,5-0,8
Peru	4	0-0,7	0-0,1
África do Sul	81	0-0,5	0-0,1
EUA	35	0-2,8	0-0,9

Fonte: Sydenham et alii, 1991

Stack & Eppley (1992) encontraram níveis elevados de FB1 em refugo de milho (milho quebrado separado por peneira) relativamente aos níveis encontrados em milho amarelo recém colhido. Stack & Eppley (1992) determinaram os níveis de FB1 e FB2 em milho e farelo de milho provenientes de diferentes estados dos EUA. O milho continha de 0,08 a 16,31 μg FB1/g e o farelo continha de 1,74 a 196 μg FB1/g. Os níveis de FB2 estiveram em torno de 1/3 dos níveis encontrados para FB1. Determinaram também os níveis de FB1 e FB2 em produtos à base de milho adquiridos em supermercados locais em Washington, D.C. num total de 36 amostras e 50% das amostras apresentaram FB1 e FB2.

Pittet et alii (1992) verificaram a ocorrência de FB1 e FB2 em 120 amostras de alimentos e rações adquiridas em mercados da Suíça. Destas 44 amostras (36,7%) continham FB1 em níveis de 0,055 a 0,790 $\mu\text{g/g}$, com uma média de 0,235 $\mu\text{g/g}$. Apenas 15 amostras (34,1%) apresentaram níveis detectáveis de FB2 (0,050-0,160 $\mu\text{g/g}$), com uma média de 0,100 $\mu\text{g/g}$. Amostras de farinha de milho (usada para polenta) apresentaram a mais alta frequência de amostras positivas (61,8%) e a mais alta concentração de FB1 (média de 0,790 $\mu\text{g/g}$). Das amostras desta farinha, 23,6% foram positivas para FB1 e FB2, com concentrações médias de 0,460 e 0,100 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Já 27,3% das amostras de rações para aves continham FB1, com o nível médio de 0,480 $\mu\text{g/g}$. Verificaram, também, a distribuição dos níveis de FB1 + FB2 em 38 produtos alimentícios à base de milho. Desses produtos 75% apresentaram concentrações abaixo de 0,100 $\mu\text{g/g}$, e 8,2% (8

amostras) continham níveis acima de 0,500 µg/g, sendo o nível de 0,955 µg/g o mais alto encontrado.

Hopmans & Murphy (1993) foram os primeiros a relatar a ocorrência da FB3 e do hidrolizado de fumonisina B1 (HFB1) em alimentos destinados ao consumo humano. Os autores analisaram 15 amostras de produtos à base de milho destinados ao consumo humano e animal correspondentes às safras de 1989 e 1990. As concentrações de FB1 e FB2 variaram de 0,017 a 1,410 µg/g e de não a 0,414 µg/g, respectivamente. A FB3 foi encontrada em 10 das 13 amostras e a HFB1 em “tortilha chips”, macarrão e milho amarelo enlatado.

Murphy et alii (1993) determinaram FB1, FB2 e FB3 em milho das safras de 1988 a 1991 (Tabela 2) e em refugo de milho de 1989. . A concentração de FB1 variou de não detectado a 14,9, a 37,9, a 19,1 e a 15,8 µg/g, no milho das safras de 1988, 1989, 1990 e 1991, respectivamente. As concentrações médias de FB2 e FB3 foram de 0,7 e 0,2, 0,8 e 0,2, 0,9 e 0,3 e 0,8 e 0,4 µg/g no milho das safras de 1988, 1989, 1990 e 1991, respectivamente. O coeficiente de correlação da regressão linear entre todas as safras pesquisadas foi estatisticamente significativo. A concentração de fumonisinas no refugo de milho foi 10 vezes maior que a concentração no milho intacto.

Tabela 2. Níveis de fumonisinas em milho das safras de 1988, 1989, 1990 e 1991 em Iowa, Wisconsin e Illinois

Ano	Número de amostras	Níveis de fumonisinas (µg/g)		
		FB1	FB2	FB3
1988	22	0-14,9	0-5,7	0-2,1
1989	44	0-37,9	0-12,3	0-4,0
1990	59	0-19,1	0-6,1	0-2,8
1991	50	0-15,8	0-4,4	0-2,3

Fonte: Murphy et alii, 1993.

Chamberlain et alii (1993) analisaram 28 amostras coletadas de plantações de milho na Georgia, EUA, em 1991, com o objetivo de verificar se aflatoxinas e FB1 ocorriam simultaneamente em milho cultivado em condições normais. Vinte sete amostras continham aflatoxinas, 24 amostras FB1, sendo que em 23 amostras as duas toxinas ocorriam ao mesmo tempo. Na amostras positivas, a concentração média de aflatoxinas totais foi 0,073 µg/g ($s=0,086$) e a concentração média para FB1 foi 0,870 µg/g ($s=0,650$). A quantidade de FB1 presente não apresentou correlação significativa com a quantidade de aflatoxinas. A concentração de aflatoxinas de 6 amostras com as mais altas concentrações de FB1 ($> 1,500$ µg/g) variaram de 0 a 0,321 µg/g, enquanto as amostras que resultaram negativas para FB1, apresentaram 0,006-0,050 µg/g de aflatoxinas totais.

Pesquisa sobre a incidência de FB1 e FB2, em milho e produtos a base de milho, no Japão, Nepal e China (Ueno et alii, 1993) revelou altos níveis de contaminação por essas toxinas nos países asiáticos. Sessenta e seis amostras de produtos a base de milho importados (EUA, Argentina, África do Sul) apresentaram níveis de FB1 e FB2 variando de 0,3-4,1 µg/g e 0,3-10,2 µg/g, respectivamente. Cinquenta e seis amostras de produtos processados à base de milho, coletados no mercado japonês, não apresentaram contaminação significativa. Entre as 24 amostras de milho provenientes do Nepal, 12 e 7 amostras foram positivas para FB1 e FB2 e os níveis variaram de 0,05-4,6 e 0,1-5,5 µg/g, respectivamente. Das 5 amostras provenientes da China, 2 foram positivas para FB1 e FB2, apresentando níveis médios de 6,8 e 3,3 µg/g, respectivamente. Foi verificada também co-contaminação do milho e produtos a base de milho com aflatoxinas.

Sanchis et alii (1994) relataram a incidência de fumonisinas em milho destinado ao consumo humano na Espanha. A ocorrência natural de FB1 e FB2, a incidência de fungos do gênero *Fusarium* e a capacidade das cepas de *Fusarium* de produzirem fumonisinas foram investigadas em 50 amostras de alimentos a base de milho e produzidos na própria Espanha. Oito amostras

(16%) apresentaram contaminação por FB1. Os níveis de contaminação foram baixos, com uma média 0,080 µg/g e variaram de 0,050 a 0,200 µg/g. Nenhuma das amostras apresentou FB2.

Doko & Visconti (1994) realizaram um levantamento sobre a incidência de fumonisinas em milho e produtos a base de milho na Itália. Os níveis de contaminação variaram com relação a FB1, de 0,01 µg/g em “com flakes” a 6,1 µg/g, em milho extrudado, e com relação a FB2, de 0,01 µg/g em “tortilla chips” a 1,48 µg/g em milho em grão.

Usleber et alii (1994) analisaram 19 amostras de alimentos a base de milho vendidos em Munique, na Alemanha, sendo alguns importados da Itália. Dezesesseis amostras continham FB1 em níveis variando de 0,012 a 1,300 µg/g. Os níveis mais altos de FB1 excederam 1000 ng/g e foram encontrados em farinha de milho para polenta.

Chatterjer & Mukherjer (1994) detectaram pela primeira vez a contaminação natural com FB1 em milho indiano contaminado com *F. moniliforme*. O nível de FB1 variou de 300-366 µg/g.

Pestka et alii (1994) realizaram levantamento sobre a ocorrência de FB1 em produtos a base de grãos que foi encontrada principalmente em produtos a base de milho. De 71 amostras, analisadas com ELISA, 11 amostras positivas e 9 amostras negativas confirmadas por CG-EM e HPLC.

Zoller & Zimmerli (1994) detectaram fumonisinas em 42 das 52 amostras de produtos a base de milho coletadas no comércio da Suíça. O nível médio de FB1 e FB2 em milho picado e farinha de milho foi de 0,406 µg/g (0,014--3,400 µg/g) e 0,095 µg/g (0,05-0,900 µg/g), respectivamente. O conteúdo médio de fumonisinas nas 11 amostras de milho picado provenientes do Equador foi aproximadamente 5 vezes o valor encontrado nas amostras originárias da Suíça.

Trucksess et alii (1995) analisaram 97 amostras de milho enlatado e de milho congelado, coletadas em diferentes áreas dos EUA. Em 60 amostras FB1 não foi detectada. Níveis baixos (0,004 - 0,082 µg FB1/g) foram encontrados em 35 amostras, exceto em uma amostra de milho enlatado e em uma amostra de milho congelado que continham 0,235 µg e 0,350 de FB1/g, respectivamente.

Em Ontário, Canadá, Miller et alii (1995) detectaram FB1 e FB2, na faixa de 0,400 a 2,500 µg/g, em 9 das 98 amostras da safra de milho de 1993.

A ocorrência natural de FB1 e FB2 foi investigada em 26 variedades de milho da Itália e em 72 híbridos provenientes da Croácia (19), Polônia (7), Portugal (9), Romênia (6), Benin (9) e Zâmbia

(20) (Doko et alii, 1995). Essa investigação constatou que genótipos de milho dos países do oeste europeu e da África parecem ser mais susceptíveis à contaminação com fumonisinas (até 3,310 µg/g de FB1 + FB2) do que os genótipos provenientes dos países da Europa Central, tais como Croácia, Polônia e Romênia ($\leq 0,070$ µg/g de FB1 + FB2).

Fumonisina B1 foi detectada em 24 das 66 amostras de milho originário de Honduras, em níveis de 0,068 a 6,555 µg/g (Julian et alii, 1995).

Shephard et alii (1996) apresentaram uma revisão sobre a ocorrência de fumonisinas em produtos destinados ao consumo humano que bem demonstra a natureza ubíqua do principal fungo produtor de fumonisinas.

Kuiper-Goodman et alii (1996) verificaram que das 361 amostras de produtos a base de milho comercializados em Canadá, 64 amostras continham concentrações maiores ou iguais a 100 ng/g de FB1 e apenas 10 amostras apresentavam níveis maiores ou iguais a 1000 ng/g.

Viquez et alii (1996) constataram que FB1 esteve presente em 89% das amostras referentes as safras 1992-1993 em Costa Rica. A média de incidência de FB1 foi de 2,130 µg/g e o máximo valor detectado foi de 6,320 µg/g.

Fazekas & Tóthné Hajdu (1995) e Fazekas et alii (1996) verificaram que o milho cultivado na Hungria encontrava-se freqüentemente contaminado com FB1. Setenta por cento do milho mofado, estocado na forma de espigas, continham FB1 na faixa de 0,095 a 52,400 µg/g (média: 6,640 µg/g). Em média 30% do milho visualmente não afetado pelo fungo apresentava contaminação na faixa de 0,060 a 5,100 µg FB1/g (média: 1,520 µg/g). Esses autores constataram também a co-ocorrência de outras fusariotoxinas.

Usleber et alii (1996) verificaram que de um levantamento com 300 amostras de alimentos contendo milho, coletadas no comércio alemão no período de 1993 a 1995, a maioria das amostras contaminadas era de milho picado e farinha de milho, com níveis máximos de 10,000 a 20,000 µg/g de fumonisinas (FB1 + FB2 + FB3).

Yoshizawa et alii (1996) encontraram FB1 e FB2 em 85% das 18 amostras de milho tailandês, coletadas nos anos de 1992 e 1993. Oitenta e nove por cento das amostras (16 amostras) apresentaram níveis de 0,063 a 18,800 µg/g (média: 1,790 µg/g) de FB1 e 67% das amostras (12 amostras) apresentaram níveis de 0,050 a 1,400 µg/g (média: 0,251 µg/g) de FB2. Foi verificada também a co-ocorrência de aflatoxinas.

Doko et alii (1996) investigaram a ocorrência natural de fumonisinas e zearalenona em cereais e alimentos a base de cereais (principalmente milho) coletados no ano de 1994 em países da África Ocidental e do Sul. Das 40 amostras analisadas 37 (92,5%) apresentaram de 0,020 a 1,910 µg/g de FB1. O teor de fumonisina total (FB1 + FB2 + FB3) nas mesmas amostras variaram de 0,020 a 2,735 µg/g.

Shetty & Blat (1997) realizaram um levantamento no qual, entre outros tipos de amostras, analisaram 25 amostras de milho afetados pela chuva e 35 amostras de milho normal coletados em 6 lugares diferentes da Índia. As amostras de milho afetado pelas chuvas continham FB1 na faixa de 0,040 a 65,000 µg/g. As amostras de milho normal estavam contaminadas com FB1 na faixa de 0,150 a 0,510 µg/g/

Rumbeiha & Oehme (1997) constataram a contaminação por fumonisinas (FB1 + FB2 + FB3) em alimentos a base de milho destinado ao consumo humano em Kansas, EUA. Os alimentos analisados continham fumonisinas na faixa de 0,042 a 0,950 µg/g, sendo a farinha de milho o produto mais freqüentemente contaminado, correspondendo a 52% das amostras positivas.

Patel et alii (1997) verificaram a presença de fumonisinas em 26% das 291 amostras coletadas no comércio do Reino Unido. Aproximadamente 78% das amostras de milho na forma de “snack” continham fumonisinas (0,011-0,220 µg/g), enquanto 24% das amostras de cereais de café da manhã continham fumonisinas entre 0,011 e 0,194 µg/g. Das amostras de milho para pipoca, 46% continham fumonisinas entre 0,014 e 0,784 µg/g. Os mais altos níveis de fumonisinas foram detectados em amostras de farinha de milho para polenta (0,016-2,124 µg/g).

Efeitos do processamento

Os estudos disponíveis revelam que níveis mais altos de fumonisinas são verificados em grãos inteiros e em produtos de milho que sofrem formas amenas de processamento físico. Produtos que são submetidos a processamentos mais drásticos (“com flakes”, “corn chips”, “tortilla chips”, pipoca, milho enlatado) tendem a se apresentar negativos ou com baixos níveis de fumonisinas. No entanto, isso poderia ser devido a problemas de recuperação da toxina durante a análise. O aparente desaparecimento das fumonisinas pode, na realidade, ser causado pela não detecção das toxinas pelos métodos de extração atualmente em uso, em vez de ser uma consequência da degradação das toxinas (Bullerman & Tsai, 1994).

Os efeitos do processamento do milho nas fumonisinas são desconhecidos e suspeita-se que alguma degradação ocorra. Amido de milho aparenta ser livre de fumonisinas, as quais tendem a ser

eliminadas na fração aquosa durante o processo de fabricação. No caso de outros tipos de processamento não há informações, no entanto, se a toxina permanece, se perde ou se liga à matriz de maneira mais resistente dificultando a sua extração durante a análise química (Bullerman & Tsai, 1994).

As formas hidrolizadas das fumonisinas FB1 e FB2 (HFB1 e HFB2) retêm atividade biológica em culturas de células de mamíferos e em bioensaios de fitotoxicidade, isto apesar de terem perdido quase a metade do peso molecular durante a conversão a partir das toxinas originais, FB1 e FB2, respectivamente. Também apresentam um largo espectro de atividade nos bioensaios de culturas de células de mamíferos. São portanto tóxicas para cepas de células não diferenciadas e diferenciadas que sejam sensíveis ao FB1 e FB2 (Abbas et alii, 1993 ; Shier et alii, 1991).

Hopmans & Murphy (1993) observaram a presença de HFB1 em uma variedade de alimentos processados de milho, incluindo “tortilla chips” e milho enlatado. Hendrich et alii (1993) atribuíram o aumento de toxicidade observada, quando dietas a base de milho contaminado com *F. proliferatum* foram expostas a alto pH e calor, à produção de fumonisinas hidrolizadas, que parecem ser mais tóxicas em ratos que as fumonisinas íntegras. Com base nessas informações, Badria et alii (1995) expressaram a opinião que muitos dos produtos processados que foram examinados quanto ao conteúdo de fumonisinas deveriam ser reexaminados para determinar se o processamento que reduziu o teor de fumonisinas não serviu, na realidade, apenas para produzir hidrolizado de fumonisinas.

2.7.3. Ocorrência de fumonisinas na América do Sul

No Brasil são freqüentes os relatos de LEME (Riet-Correa et alii, 1982; Brito et alii, 1982; Barros, et alii, 1984; Hirooka et alii, 1988; Hirooka et alii, 1990; Meireles et alii, 1992; Meireles et alii, 1993). O *F. moniliforme*, por sua vez, tem sido encontrado como um contaminante freqüente em milho e outros cereais (Xavier et alii, 1991; Meireles et alii, 1994; Hirooka et alii, 1988; Furlong et alii, 1992; Pozzi et alii, 1995).

A análise de 21 amostras de rações associadas a casos de micotoxicoses provenientes da área de Londrina, no estado do Paraná, revelaram que 20 continham FB1 e 18 continham FB2 (Sydenham et alii, 1992b).

Meireles et alii (1992) estudaram 29 surtos de LEME nos anos de 1988, 1989 e 1990 nos estados do Rio Grande do Sul (13 casos), São Paulo (12 casos), Santa Catarina (2 casos) e Minas Gerais (2 casos). Das 17 mortes diagnosticadas como LEME, 14 estavam relacionadas com a ingestão de ração contaminada com FB1.

Determinações semi-quantitativas foram realizadas em 32 componentes de rações relacionadas com surtos de LEME. Em 26 dessas amostras foi encontrada FB1, em concentrações entre 10 µg/g a < 500 µg/g (42,3%) e ≥ 500 µg/g (57,7%) (Meireles, 1993).

Frente à ocorrência de freqüentes intoxicações animais no estado do Paraná, Yamagushi et alii (1992) determinaram os níveis de fumonisinas em 39 lotes de milho colhido nas safras de 1990 - 1991, de quatro regiões produtoras. Os resultados variaram de 0,60 a 12,55 µg/g de FB1 e 0,0 a 10,24 µg/g de FB2. (Tabela 3).

Tabela 3. Níveis de fumonisinas em milho das safras 1990 -1991 no Estado do Paraná

Região	Número de amostras	Níveis de fumonisinas (µg/g)	
		FB1	FB2
Norte	27	1,66-12,55	1,20-10,24
Centro-oeste	3	2,96-3,89	2,17-2,78
Centro-leste	7	0,60-6,98	0,00-4,79
Central	2	0,00-5,54	0,00-5,09

Fonte: Yamagushi et alii, 1992

Hirooka et alii (1994) analisaram 11 amostras de rações destinadas a alimentação animal envolvidas em 6 casos de intoxicações em eqüinos e aves. A FB1 foi detectada em níveis de 2,15 a 10,65 µg/g e FB2 em níveis de 1,85 a 10,15 µg/g.

Hirooka et alii (1996) também investigaram 48 amostras de milho das safras de 1990 - 1991, 39 provenientes do Paraná e 9 do Mato Grosso do Sul e Goiás. Das amostras analisadas, 97,4% apresentaram-se positivas para FB1 e 94,8% para FB2. As amostras provenientes do Paraná continham 0,60 a 12,55 e 1,2 a 10,24 µg/g de FB1 e FB2, respectivamente. Uma única amostra proveniente de Goiás apresentou 5,83 µg/g de FB1 e 3,62 µg/g de FB2. A faixa de FB1 em milho naturalmente contaminado foi de 5,0 a 7,5 µg/g, e para FB2 foi de 2,5 a 5,0 µg/g. Um total de 4 amostras excederam 10 µg/g, valor considerado crítico para o desencadeamento de LEME.

Sydenham et alii (1993) relataram pela primeira vez a ocorrência natural de fumonisinas em milho na Argentina. A ocorrência de FB1, FB2 e FB3 em milho durante seu desenvolvimento no

campo até a época de colheita foi estudado por Chulze et alii (1996) na província de Córdoba, Argentina. Baixos níveis de fumonisinas foram detectados nos primeiros estágios de desenvolvimento. Nas amostras coletadas após a maturidade fisiológica, os níveis de FB1 em média apresentaram-se acima de 1,000 µg/g. Os níveis de FB2 e FB3, por sua vez, foram similares, mas menores que os de FB1. Com exceção de uma amostra, FB2 e FB3 somente foram detectadas nos últimos estágios de desenvolvimento.

Ramirez et alii (1996) investigaram a ocorrência de fumonisinas em 50 híbridos comerciais de milho, com diferentes características de endosperma, cultivados em uma mesma área geográfica (província de Córdoba, Argentina). A faixa de contaminação encontrada em todos os híbridos analisados foi de 0,185 a 27,050 µg/g para FB1 e de 0,040 a 9,950 µg/g para FB2. Dezoito híbridos apresentaram níveis de fumonisinas menores que 1,000 µg/g, o que sugere a possibilidade de seleção de híbridos menos susceptíveis a contaminação com fumonisinas.

Sanhueza & Resnik (1997) constataram a presença de FB1 (1,585-9,990 µg/g) nas 17 amostras de híbridos comerciais coletadas em 1991 em duas estações experimentais da Província de Buenos Aires.

Meister et alii (1996) detectaram a presença de fumonisinas (FB1-FB3) nas 21 amostras de milho importado da Argentina. O conteúdo médio de fumonisinas foi de 0,175 µg/g e variou de 0,014 a 1,106 µg/g.

Farnochi et alii (1996) realizaram um levantamento sobre a ocorrência natural de fumonisinas em produtos a base de milho disponíveis no comércio e em milho verde produzidos na Argentina. Todas as amostras de milho verde continham níveis de fumonisinas que variaram de 0,199 a 0,948 µg/g para FB1, de 0,033 a 0,199 µg/g para FB2 e de 0,029 a 0,092 µg/g para FB3. Foram detectados baixos níveis de FB1 em milho enlatado e em farinha de milho.

No Uruguai foi demonstrada a ocorrência natural de fumonisinas através de um levantamento em produtos a base de milho de diferentes marcas. Foram coletadas 64 amostras a nível de comércio no período de janeiro de 1995 a abril de 1996 e analisadas quanto a ocorrência de FB1 e FB2 (Piñero et alii, 1996). Os níveis de contaminação variaram de 0,050 a 6,342 µg/g. A mais alta contaminação foi encontrada em amostras de ração (até 6,342 µg/g), milho em grão não processado (até 3,688 µg/g), e produtos moídos, como farinha para polenta (até 0,427 µg/g). Em amostras de milho processado (até 0,155 µg/g) e milho na forma de "snack" (até 0,314 µg/g) a contaminação foi menor. Foi detectada FB2 em um quarto do total das amostras.

2.8. Metodologia analítica para determinação de fumonisinas

Culturas de laboratório de *F. moniliforme* produzem FB1 em níveis que podem atingir partes por milhão. Em milho naturalmente contaminado e em farelo de milho os níveis esperados são muito mais baixos. Ross et alii, 1991 indicam que níveis de 1 - 150 µg/g de FB1 foram quantificados em amostras associadas com leucoencefalomalácia eqüina, e níveis de 1 - 330 µg/g foram encontrados em amostras associadas com toxicoses em suínos. Amostras não associadas a toxicoses continham níveis muito menores, geralmente < 6 µg/g.

Os métodos analíticos para determinação de fumonisinas foram desenvolvidos primeiramente para análise de culturas do fungo *F. moniliforme* (Gelderblom et alii, 1988; Jackson & Bennett, 1990; Voss et alii, 1990; Sydenham et alii, 1990b; Alberts et alii, 1992). A análise de culturas permite a utilização de métodos com limite de detecção maiores.

2.8.1. Estabilidade das soluções padrão de fumonisinas

A estabilidade da FB1 e FB2, durante a estocagem por 6 semanas, em acetonitrila:água (1:1) e metanol, em 4 diferentes temperaturas de estocagem (-18, 4, 25 e 40 °C) foi estudada por Visconti et alii (1994). Em solução metanólica foi evidente a decomposição das fumonisinas após 6 semanas nas temperaturas de 4, 25 e 40°C. Os sinais para ambas as fumonisinas diminuíram 5 e 60%, respectivamente. Nenhuma perda foi observada nas soluções metanólicas a -18°C. Tanto FB1 quanto FB2 se apresentaram estáveis quando estocadas em solução acetonitrila:água (1:1) por 6 meses nas temperaturas de -18, 4 e 25°C. Portanto, o solvente mais adequado para as soluções de referência de fumonisinas é acetonitrila:água (1:1).

2.8.2. Extração

Os métodos de análise aplicados a alimentos e rações envolvem extração com solventes polares. A mistura mais comumente utilizada é metanol:água (3:1) (Plattner et alii, 1990; Scott & Lawrence, 1992; Shephard et alii, 1990; Stack & Eppley, 1992; Sydenham et alii, 1990 a, b). Uma outra mistura de extração é acetonitrila:água (1:1) (Ross et alii, 1991b; Wilson et alii, 1990; Norred et alii, 1991a; Rottinghaus et alii, 1992; Bennett & Richard, 1992; Murphy et alii, 1993; Hopmans & Murphy, 1993; Holcomb et alii, 1993a,b; Rice & Ross, 1994; Yoshizawa et alii, 1994; Stockenstrom et alii, 1994; Shelby et alii, 1994).

Bennett & Richard (1994) investigaram diferentes proporções de metanol ou acetonitrila com água na extração de FB1 de culturas de laboratório, rações e milho, e verificaram que a eficiência de extração máxima foi obtida com acetonitrila:água (1:1). Scott e Lawrence (1994) alertam para o fato que FB1 e FB2 não são bem extraídas, em farinha de farelo de milho, quando o solvente de extração utilizado é metanol:água (3:1) e concluem que cada produto deve ser estudado para obtenção de extração máxima.

O uso de um pH ótimo de extração de 3,5 aumenta a recuperação da fumonisina em certos produtos. A influência do pH de extração parece ser mais pronunciada no caso da FB1. Isso poderia ser atribuído ao fato de FB2 e FB3 serem menos polares que FB1 (Alberts et alii, 1992).

Plattner et alii (1990), Cawood et alii (1991) e Sanchis et alii (1994) utilizaram uma etapa de extração em acetato de etila, antes da extração, propriamente dita, com metanol:água (3:1), para remover material lipossolúvel, o qual poderia interferir nas etapas subseqüentes de limpeza do extrato.

A recuperação de fumonisinas em amostras artificialmente contaminadas é geralmente maior que 80%. No entanto, não está definido o quão eficientes são os métodos de extração para todas as fumonisinas, quando a contaminação da matriz é natural (Bothast et alii, 1990). Cawood et alii (1991) verificaram que metanol aquoso recupera bem FB1 (81,3%), concordando com os resultados obtidos por Alberts et alii (1990). Observou, porém, que esse sistema de solvente não é bom para a extração de FB2 (59,8%). Alto percentual de recuperação para ambas, FB1 (98%) e FB2 (97,5%), foi obtido a partir da fase aquosa, após a etapa de partição em clorofórmio.

2.8.3. Limpeza de extratos

Os procedimentos de limpeza, em sua maioria, têm utilizado dois tipos de adsorventes na forma de colunas de extração em fase sólida: colunas de troca aniônica forte constituídas de aminas quaternárias, como, por exemplo, trimetilaminopropil (Shephard et alii, 1990; Sydenham et alii, 1992b) e colunas em fase reversa C18 (Wilson et alii, 1990; Ross et alii, 1991b; Norred et alii, 1991a; Rice et alii, 1995). Colunas clássicas de sílica gel 60 (70-230 mesh) abertas, também foram empregadas na limpeza de extratos metanólicos contendo fumonisinas (Sydenham et alii, 1990a; Plattner et alii, 1990).

Colunas de Amberlite XAD-2 tem sido usadas para limpeza de extratos de culturas de laboratório ou amostras associadas à toxicoses (Gelderblom et alii, 1988; Voss et alii, 1989; Jackson & Bennett, 1990; Plattner et alii, 1990; Voss et alii, 1990).

2.8.4. Cromatografia

A detecção de fumonisinas por cromatografia líquida de alta eficiência ou por cromatografia em camada delgada exige derivação. Os métodos por cromatografia gasosa, por sua vez, exigem hidrólise básica para remover os grupos de ácido tricarbálico e derivação do grupo amino para conseguir volatilização adequada. A vantagem da cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas é a obtenção simultânea de dados confirmatórios e quantitativos. No entanto, o método é laborioso e o equipamento sofisticado.

Cromatografia em camada delgada e em coluna aberta

As fumonisinas podem ser separadas por cromatografia em camada delgada. Mais comumente usa-se como solvente de eluição metanol:água (3:1) e placas de fase reversa (octadecilsilil). A visualização é obtida por borrifamento da placa com p-anisaldeído 0,5% acidificado, seguido de aquecimento a 120°C (Gelderblom et alii, 1988; Sala et alii, 1994). A reação de derivação envolve o grupo amino primário da fumonisina. Esse método possui nível de detecção de 10-40 µg/g e encontra uso em triagem. Também placas de fase normal, de alta eficiência ou não, podem ser empregadas na determinação de fumonisinas em culturas de fungos (Jackson & Bennett, 1990; Voss et alii, 1990; Cawood et alii, 1991; Sydenham et alii, 1990a; Nelson et al, 1991). A fase normal foi utilizada também para triagem de rações animais associadas a intoxicações, tendo como solvente de desenvolvimento clorofórmio:metanol:ácido acético (6:3:1) (Ross et alii, 1991a,b; Wilson et alii, 1990). O uso de desenvolvimento em duas etapas na mesma direção simplifica o procedimento de extração e permite quantificar o derivado da fumonisina com p-anisaldeído por densitometria (Le Bars et alii, 1994). O limite de detecção obtido neste caso foi de 50 µg/g.

Placas de fase reversa reveladas com fluorescamina/tampão borato de sódio pH 8-9 têm possibilitado níveis de detecção de 0,1 µg/g, dependendo da limpeza prévia dos extratos (Rottinghaus et alii, 1992; Stockenström et alii, 1994; Shelby et alii, 1994).

O uso de cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa e revelação com solução de vanilina 0,5% em H₂SO₄ 97%/etanol (4:1) aquecido a 120°C/10 min, pode atingir limite de detecção de 250 ng FB1/g em alimentos a base de milho (Pittet et alii, 1992).

A detecção de fumonisina pelo uso de fluorescamina foi obtida a nível de 50 ng/g em um teste de campo rápido conhecido como imobilização e detecção química seletiva (CSID) em coluna

(Phillips et alii, 1992) que é constituída de uma interface sólida de sílica gel empacotada com outros adsorventes.

Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência foi usada pela primeira vez para determinação de fumonisinas através da formação do derivado maleil que absorve a 250 nm (Gelderblom et alii, 1988). Este foi um procedimento usado anteriormente por Siler & Gilchrist (1982) para análise de toxinas AAL, que são estruturalmente similares às fumonisinas. Os derivados de maleil eluem em colunas de fase reversa C18 com metanol:tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 3,8 (7:3). O método de derivação com anidrido maléico, com posterior cromatografia líquida de alta eficiência e detecção em ultravioleta a 250 nm, foi utilizado por Sydenham et alii(1990a) para análise de milho naturalmente contaminado. Foi verificado que o limite de detecção não é adequado para análise desse tipo de amostra. No entanto, Alberts et alii (1990) encontrou que esse método de derivação possui limite de detecção satisfatório (aproximadamente 10 µg/g) para análise de fumonisinas em culturas de *F. moniliforme* em milho. O percentual de recuperação do método é de aproximadamente 85%, em amostra fortificada a nível de 3000 µg/g.

Vesonder et alii (1990) desenvolveu um método para isolamento de fumonisina proveniente de culturas de *F. moniliforme* por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando detetor de índice de refração.

Fluorescamina é um outro reagente de derivação que tem sido utilizado para derivação pré-coluna do grupo amino primário das fumonisinas. O derivado formado é separado em coluna de fase reversa e detectado por fluorescência. Esse derivado tem a desvantagem de apresentar dois picos durante a corrida cromatográfica, resultantes do equilíbrio entre a mistura das formas ácido/álcool e os derivados tipo lactona (Ross et alii, 1991b; Sydenham et alii, 1990a; Wilson et alii, 1990).

Shephard et alii (1990) desenvolveram um método por CLAE para a determinação quantitativa de FB1 e FB2. Esse método utiliza como reagente de derivação pré-coluna o o-ftaldeído (OPA). O derivado formado é separado isocraticamente, usando metanol:tampão fosfato, em pH suficientemente ácido de forma a suprimir a ionização da porção ácida tricarbalílica. A detecção dá-se por fluorescência. Shephard et alii (1990) aplicou o método para análise de milho naturalmente contaminado, tanto de rações destinadas a alimentação de eqüinos como também de culturas de fungos produtores de fumonisinas. Os limites de detecção alcançados foram de 50 ng/g para FB1 e 100 ng/g para FB2. O método é reprodutível e pode atingir recuperações de 99,5 e 85,9% para FB1

requer longo tempo de reação (6h) e alta temperatura (60°C). O sistema de derivação pós-coluna com OPA e N-acetil-L-cisteína é sugerido como método rápido para triagem.

Cromatografia gasosa

A análise de fumonisinas hidrolisadas por cromatografia gasosa capilar, segundo Sydenham et alii (1990a), baseia-se na esterificação com isobutanol, seguida de acetilação com anidrido heptafluorobutírico e detecção em ionização de chama. Análises mais específicas foram conseguidas pela determinação do aminopoliol, resultante da hidrólise da fumonisina após limpeza em XAD-2 e subsequente derivação com trimetilsilil (TMS) ou trifluoroacetato (TFA) ou N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA). Estes reagentes produzem derivados de aminopentol e aminotetraol originados de FB1 e FB2, respectivamente, e são separados por CG capilar e detectados por ionização de chama ou espectrometria de massas (Jackson & Bennett, 1990; Plattner et alii, 1990; Voss et alii, 1990; Wilson et alii, 1990; Sydenham et alii, 1990a). Os derivados FB2-TMS e FB3-TMS aminotetraois não foram separados (Plattner et alii, 1992). Mirocha et alii (1992) analisaram o derivado FB1-TFA por LSIMS (liquid secondary ion mass spectrometry) confirmando também por bombardeamento atômico rápido (FAB). Chen et alii (1992) usaram EM e EM/EM para detecção e identificação de FB1 previamente separada por cromatografia líquida.

2.8.5. Imunoensaio

Métodos de análise utilizando imunoensaio têm sido desenvolvidos desde o sucesso na produção de anticorpos policlonais (Azcona-Oliveira et alii, 1992a) e monoclonais (Azcona-Oliveira et alii, 1992b) contra FB1, FB2 e FB3. Esses anticorpos têm sido usados para fazer triagem de fumonisinas e metabólitos relacionados em alimentos, rações animais e tecidos (Pestka et alii, 1992; Leber et alii, 1994; Shelby et alii, 1994). Colunas de imunoafinidade têm sido utilizadas para isolar fumonisinas de extratos aquosos de milho e de leite para posterior quantificação por CLAE, na forma de derivados de OPA ou NAD, usando detetor de fluorescência (Hansen et alii, 1992; Scott et al, 1994; Trucksess et alii, 1995; Scott & Trucksess, 1997). A análise de FB1 e FB2 em leite utilizando imunoensaio mostrou menor sensibilidade (250ng FB1/ml) que a análise por CLAE e derivação pré-coluna com NAD (5ng FB1/ml e 5ng FB2/ml) (Maragos & Richard, 1994).

Tejada-Simon et alii (1995) compararam a produção de fumonisina em culturas de *Fusarium* utilizando imunoensaio e CLAE e, ainda, procuraram localizar a fumonisina no fungo por técnica de

e FB2, respectivamente. Esse método foi selecionado, apesar do derivado fumonisina-OPA ser instável, como método de escolha pela *Food Chemistry Commission of the International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) para ser avaliado em um estudo colaborativo interlaboratorial a fim de estabelecer um método de análise dessas toxinas que fosse internacionalmente aceitável (Thiel et alii, 1993). O estudo colaborativo foi realizado (Sydenham et alii, 1996) e esse método de análise de FB1, FB2 e FB3 foi adotado pela *AOAC International* (AOAC, 1996).

O método desenvolvido por Shephard et alii (1990) tem sido utilizado por vários pesquisadores com pequenas variações (Stack & Eppley, 1992; Thiel et alii, 1993), incluindo a detecção de FB3 (Sydenham et alii, 1992a). A etapa de derivação pode ser automatizada (Chamberlain et alii, 1992). Análises reprodutíveis, sensíveis e exatas foram desenvolvidas para determinação de FB1 em plasma e urina (Shephard et alii, 1992), e fezes (Shephard et alii 1994a,b).

O problema da instabilidade do derivado de OPA, dificulta a análise de grande número de amostras, pois não permite o uso de injetor automático. Essa situação cria a necessidade de busca de outros compostos de derivação de fumonisinas para detecção por ultravioleta e, mais comumente, para detecção por fluorescência.

Outros compostos de derivação para análise de fumonisinas por CLAE que têm sido utilizados são:

- a) 4-fluoro-7-nitrobenzofurazona (NBD-F) (Scott & Lawrence, 1992, 1994; Rapior et alii, 1993; Miller et alii, 1993)
- b) naftaleno-2,3-dicarboxaldeído/cianeto de potássio/sódio (NDA-KCN ou NDA-NaCN) (Scott & Lawrence, 1992, 1994; Bothast et alii, 1992; Ware et alii, 1993; Bennett & Richard, 1994; Maragos & Richard, 1994)
- c) 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC) (Holcomb et alii, 1993b);
- d) 5-isotiocianato fluoresceína (FITC isômero I) (Maragos, 1995);
- e) 6-aminoquinolil N-hidroxi succinimidilcarbamato (AccQ.Fluor) (Velásquez et alii, 1995);
- f) 4-(N,N-dimetil aminosulfonil)-7 fluor 2,1,3-benzoxadiazole (DBD-F) (Akiyama et alii, 1995);
- g) OPA com N-acetil-L-cisteína, em pH 9(derivação pós-coluna)(Miyahara et alii, 1996).

Os derivados NDA (Bennett & Richard, 1994), NBD-F (Miller et alii, 1993) e AccQ.Fluor (Velásquez et alii, 1995) são mais estáveis que os derivados de OPA. A sensibilidade alcançada com FITC é menor do que a alcançada com derivados de NDA (Maragos, 1995). O derivado de FMOC, por sua vez, (Holcomb et alii, 1993) é estável por 72 horas e o limite de detecção em rações atinge 0,2 µg/g, o que não é adequado na análise de alimentos. O derivado DBD-F é estável mas

imunocitoquímica. As três técnicas apresentaram correlação entre elas, mas os resultados obtidos por imunoensaio são consideravelmente mais altos que os resultados obtidos por CLAE.

O desenvolvimento de imunoensaios e sua comparação com análises por CLAE têm constatado que os primeiros tendem a apresentar muitos falsos positivos sendo portanto mais indicados como método de triagem de fumonisinas em milho, ração animal e alimentos (Schneider et alii, 1995; Abouzied et alii, 1995; Sutikno et alii, 1996; Sydenham et alii, 1996).

2.8.6. Eletroforese Capilar

Devido à presença de grupos ácidos tricarbálicos, as fumonisinas podem ser separadas por técnicas eletroforéticas pela aplicação de eletroforese de zona capilar e detecção dos derivados FB1, FB2 e FB1 hidrolisado, com detetor de fluorescência induzida a laser. No entanto, esse método revelou-se de menor sensibilidade (50ng FB1/ml) em soro de cavalo (Maragos, 1995) que o método por CLAE e derivação com NAD em leite (5ng FB1/ml)(Maragos & Richard, 1994). A análise de fumonisinas em milho por esse método teve como nível mínimo detectável 50 ng/g FB1 (Maragos et alii, 1996). O acoplamento da eletroforese capilar com espectrometria de massas por ionização química teve 156 ng/g como nível de detecção (Hines et alii, 1995).

2.9. Referências bibliográficas

ABBAS, H.K.; BOYETTE, D.; HOAGLAND, R.E. & VESONDER, R.F. Bioherbicidal potential of *Fusarium moniliforme* and its phytotoxin, fumonisin. **Weed Science**, Ithaca, USA , v. 39, n. 4, p. 673-677, Oct./Dec., 1991.

ABBAS, H.K. & BOYETTE, C.D. Phytotoxicity of fumonisin B1 on weed and crop species. **Weed Technology**, Champaign, USA, v. 6, n. 3, p. 648-652, July/Sept., 1992.

ABBAS, H.K.; GELDERBLOM, W.C.A.; CAWOOD, M.E. & SHIER, W.T. Biological activities of fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*, in jimsonweed (*Datura stramonium* L.) and mammalian cell cultures. **Toxicon**, London, UK, v. 31, n.3, p. 345-353, Mar., 1993.

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, USA, v. 79, n. 6, p. 642, 1995.

ABOUZIED, M.M.; ASKEGARRD, S.D.; BIRD, C.B.; MILLER, B.M. Development of a rapid quantitative ELISA for determination of the mycotoxin fumonisin in food and feed. **Journal of Clinical Ligand Assay**, v. 18, n. 3, p. 145-149, Fall, 1995.

AKIYAMA, H.; MIYAHARA, M.; TOYODA, M. & SAITO, Y. Liquid chromatographic determination of fumonisin B1 and B2 in corn by precolumn derivatization with 4-(N,N-dimethyl aminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-F). **J. Food Hyg. Soc. Jpn.**, v.36, p. 77-81, 1995.

ALBERTS, J.F.; GELDERBLOM, W.C.A.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; VAN SCHALKWYK, D.J. & BEHREND, Y. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 56, n.6, p. 1729-1733, June, 1990.

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 B1 mycotoxins in corn cultures. **Mycotoxin Research**, Mainz, Germany, v.8, p. 2-12, 1992.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists, 16ª edição, Washington, DC., 1996.

AZCONA-OLIVEIRA, 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, DC, USA, v. 58, n. 1, p. 169-173, Jan., 1992a.

AZCONA-OLIVEIRA, 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, DC, USA, v.40, n. 3, p. 531-534, Mar., 1992b.

BADRIA, F.A. ; ABBAS, H.K. & SHIER, T. Chemical transformation of hydrolized fumonisin B1 to hidrolized fumonisin B2. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, Washington, D.C., U.S.A., v. 43, n.8, p. 1989 – 1992, agosto 1995.

BACON, C.W. & WILLIAMSON, J.W. Interactions of *Fusarium moniliforme*, its metabolites and bacteria with corn. **Mycopathologia**, Dordrecht, The Netherlands, v. 117, n. 1-2, p. 65-71, Feb., 1992.

BARROS, C.L.S; BARROS, S.S.; SANTOS, M.N. & SOUZA, M.A. Leucoencefalomalácia em eqüinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 3, p. 101-107, 1984.

BEIER, R.C.; ELISSALDE, M.H. & STANKER, L.H. Calculated three dimensional structures of the fumonisin B1-B4 mycotoxins. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, USA, v. 54, n. 4, p. 479-487, Apr., 1995.

BENNETT, G.A. & RICHARD, J.L. Liquid chromatographic method for analysis of the naphthalene dicarboxaldehyde derivative of fumonisins. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, USA, v. 77, n. 2, p. 501-506, Mar./Apr., 1994.

BEZUIDENHOUT, S.C.; GELDERBLOM, W.C.A.; GORST-ALLMAN, C.P.; HORAK, R.M.; MARASAS, W.F.O.; SPITELLER, G. & VLEGGAR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, Cambridge, UK, s.v., n. 11, p. 743-745, June, 1988.

BINKERD, K.A.; SCOTT, D.H.; EVERTON, R.J.; SULLIVAN, J.M. & ROBINSON, F.R. Fumonisin contamination of the 1991 Indiana corn crop and its effects on horses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, USA, v. 5, p. 653-655, 1993.

BLANEY, B.J. *Fusarium* and *Alternaria* toxins. In: CHAMP, B.R.; HIGHLEY, E.; HOCKING, A.D. & PITT, J.I. (eds). **Fungi and Mycotoxins in Stored Products: proceedings of an international conference**, Bangkok, Thailand, 23-26 April 1991. ACIAR Proceedings No. 36, Canberra, Australian, pp. 86-98, 1991.

BONDY, G.S.; SUZUKI, C.A .M.; FERNIE, S.M.; ARMSTRONG, C.L.; HIERLIHY, S.L.; SAVARD, M.E.; BAKER, M.G. Toxicity of fumonisin B1 to B6C3F1 mice: a 14 – day gavage study. *Food and Chemical Toxicology*, Amsterdam, The Netherlands, v. 35, 981 – 989, 1997.

BORDSON, G.O.; MEERDINK, G.L.; BAUER, K.J. & TUMBLESON, M.E. Effects of drying temperature on fumonisin recovery from feeds. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, USA, v. 78, n. 5, p. 1183-1188, Sept./Oct., 1995.

BOTHAST, R.J.; BENNETT, G.A; VANCAUWENBERGE, J.E. & RICHARD, J.L. Fate of fumonisin B1 in naturally contaminated corn during ethanol fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 58, n. 1, p. 233-236, Jan., 1992.

BOTTALICO, A.; LOGRIECO, 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**, Basingstoke, UK, v.12, n. 4, p. 599-607, July/Aug., 1995.

BOTTINI, A.T.; BOWEN, J.R. & GILCHRIST, D.G. Phytotoxins. II. Characterization of a phytotoxic fraction from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, UK, v. 22, n. 29, p. 2723-2726, Jan. 1981.

BRANHAM, B.E. & PLATTNER, R.D. Isolation and characterization of a new fumonisin from liquid cultures of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, USA, v. 56, n. 9, p. 1630-1633, Sept., 1993.

BRITO, L.A.B.; NOGUEIRA, R.H.G.; PEREIRA, J.J. & CHQUILOFF, M.A.G. Leucoencefalomalácia em equino associada à ingestão de milho mofado. **Arquivos da Escola Veterinária da UFMG**, Belo Horizonte, **34**(1): 49-53, abril 1982.

BUCCI, T.; HANSEN, D.K. LABORDE, J.B. Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxins Fumonisin B1. *Natural toxins*, New York, E.U.A, v.4, 51 – 52, 1996.

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*, Ames, U.S.A . , v. 57, p. 541 – 546, Junho 1994.

CANELA, R.; PUJOL, R.; SALA, N. & SANCHIS, V. Fate of fumonisins B1 and B2 in steeped corn kernels. **Food Additives and Contaminants**, Basingstoke, UK, v. 13, n. 5, p. 511-517, July, 1996.

CAWOOD, M.E.; GELDERBLOM, W.C.A.; VLEGGAAR, R.; BEHREND, Y.; THIEL, P.G. & MARASAS, W.F.O. Isolation of the fumonisin mycotoxins: a qualitative approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, USA, v. 39, n. 11, p. 1958-1962, Nov., 1991.

CAHAGNIER, B.; MELCION, D. & RICHARD-MOLARD, D. Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B1 on maize grain as a function of different water activities. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, UK, v. 20, n. 4, p. 247-251, Apr., 1995.

CHAMBERLAIN, W.J.; NORRED, W.P. & BACON, C.W. Isolation and quantitation of fumonisins from corn infected with *Fusarium moniliforme*. **VIII International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**, Nov. 8-11, 1992, New Mexico, Mexico, p.121 (Abstract).

CHAMBERLAIN, W.J.; BACON, C.W.; NORRED, W.P. & VOSS, K.A. Levels of fumonisin B1 in corn naturally contaminated with aflatoxins. **Food Chemistry and Toxicology**, Exeter, UK, v. 31, n. 12, p. 995-998, Dec., 1993.

CHATTERJEE, D. & MUKHERJEE, S.K. Contamination of Indian maize with fumonisin B1 and its effects on chicken macrophage. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, UK, v. 18, n. 5, p. 251-253, May, 1994.

CHEN, J.; MIROCHA, C.J.; XIE, W.; HOGGE, L. & OLSON, D. Production of the mycotoxin fumonisin B1 by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 58, n. 12, p. 3928-3931, Dec., 1992.

CHENG, S.J.; JIANG, Y.Z.; LI, M.H. & LO, H.Z. A mutagenic metabolite produced by *Fusarium moniliforme* isolated from Linxian county, China. **Carcinogenesis**, Oxford, UK, v.6, n. 6, p. 903-905, 1985.

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, DC, USA, v. 60, n. 3, p. 847-852, Mar., 1994.

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, DC, USA, v. 44, n. 9, p. 2797-2801, Sept., 1996.

COLVIN, B.M. & HARRISON, L.R. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. **Mycopathologia**, Dordrecht, The Netherlands, v.117, n. 1-2, p. 79-82, Feb., 1992.

DE LEON, C.; & PANDEY, S. Improvement of resistance to ear and stalk rots and agronomic traits in tropical maize gene pools. **Crop Science**, Madison, USA, v.29, n. 1, p. 12-17, Jan./Feb., 1989.

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

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

DOEHLERT, D.C.; KNUTSON, C.A. & VESONDER, R.F. Phytotoxic effects of fumonisin B1 on maize seedling growth. **Mycopathologia**, Dordrecht, The Netherlands, v. 127, n. 2, p. 117-121, Feb., 1994.

DOKO, M.B. & VISCONTI, A. Occurrence of fumonisins B1 and B2 in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. **Food Additives and Contaminants**, Basingstoke, UK, v. 11, n. 4, p. 433-439, July/Aug., 1994.

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, DC, USA, v. 43, n. 2, p. 429-434, Feb., 1995.

DOKO, M.B.; CANET, C.; BROWN, N., SYDENHAM, E.W.; MPUCHNE, 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, DC, USA, v. 44, n. 10, p. 3240-3243, Oct., 1996.

DUPUY, J.; LE BARS, P.; BOUDRA, H. & LE BARS, J. Thermostability of fumonisin B1, a mycotoxin from *Fusarium moniliforme*, in corn. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 59, n. 9, p. 2864-2867, Sept., 1993.

FARNOCHI, M.C.; DALCERO, A.; PASCALE, M.; VISCONTI, A. & CHULZE, S. Occurrence of fumonisins in sweet corn and corn-based human foodstuffs in Argentina. **IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**, May 27-31, 1996, Rome, Italy, p. 159 (Abstract).

FAZEKAS, B. & TÓTHNÉ HAJDÚ, E. Incidence of fumonisin B1 mycotoxin in maize cultivated in Hungary (em húngaro, com resumo em inglês). **Magyar Állatorvosok Lapja**, v. 50, p. 515-518, 1995.

FAZEKAS, B.; KIS, M. & TÓTHNÉ HAJDÚ, E. Data on the contamination of maize with fumonisin B1 and other fusariotoxins in Hungary. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 44, n. 1, p. 25-37, 1996.

FURLONG, E.B.; SOARES, L.M.V.; LASCA, C.C. & KOHARA, E.Y. Mycotoxins and fungi in two wheat cultivars harvested during 1990 in test plots in the State of São Paulo, Brazil. In: **VIII Internacional IUPAC Symposium On Mycotoxins And Phycotoxins**. Nov. 8-11, 1992, Mexico City, México, p. 135 (Abstract).

GELDERBLOM, W.C.A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; HORAK, R.M.; VLEGGAAR, R. & KRIEK, P.J. Fumonisins - novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 54, n. 7, p. 1806-1811, July, 1988.

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, UK, v. 12, n. 7, p. 1247-1251, 1991.

GELDERBLOM, W.C.A.; SEMPLE, E.; MARASAS, W.F.O. & FARBER, E. The cancer-initiating potential of the fumonisin B mycotoxins. **Carcinogenesis**, Oxford, UK, v. 13, n. 3, p. 433-437, 1992.

GELDERBLOM, W.C.A. & SNYMAN, S.D. Mutagenicity of potentially carcinogenic mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. **Mycotoxin Research**, Mainz, Germany, v. 7, p. 46-52, 1991.

- GILCHRIST, D.G.; WARD, B.; MOUSSATO, V. & MIROCHA, C.J. Genetic and physiological response to fumonisin and AAL-toxin by intact tissue of a higher plant. **Mycopathologia**, Dordrecht, The Netherlands, v. 117, n. 1/2, p. 57-64, Feb., 1992.
- HANSEN, T.J.; ZABE, N.A.; SKIPPER, P.L. Immunoaffinity isolation of fumonisin B1 and application to analysis in corn. **106th AOAC International Annual Meeting**, Aug. 31 - Sept. 3, 1992, Cincinnati, Ohio, p.230. In: RILEY, R.T.; NORRED, W.P. & BACON, C.W. Fungal toxins in foods: recent concerns. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, USA, v. 13, p. 167-189, 1993.
- HANSEN, T.J. Quantitative testing for mycotoxins. **Cereal Foods World**, Minneapolis, USA, v. 38, n. 5, p. 346-348, May, 1993.
- HARRISON, L.R.; COLVIN, B.M.; GREENE, J.T.; NEWMAN, L.E. & COLE, Jr, J.R. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, USA, v. 2, p. 217-221, 1990.
- 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, The Netherlands, v. 117, n. 1/2, p. 83-96, 1992.
- HENDRICH, S.; MILLER, K.A.; WILSON, T.M. & MURPHY, P.A. Toxicity of *Fusarium proliferatum*-fermented nixtamalized corn-based diets fed to rats: effects of nutritional status. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, USA, v. 41, n. 10, p. 1649-1654, Oct., 1993.
- HINES, H.B.; BRÜGGEMANN, E.E.; HOLCOMB, M. & HOLDER, C.L. Fumonisin B1 analysis with capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications on Mass Spectrometry**, v. 9, n. 6, p. 519-524, 1995 (abstract).
- HIROOKA, E.Y.; VIOTTI, N.M.A.; SOARES, L.M.V. & ALFIERI, A.A. Intoxicação em eqüinos por micotoxinas produzidas por *Fusarium moniliforme* no norte do Paraná. **Semina**, Londrina, v. 9, n. 3, p. 128-135, Dec., 1988.
- HIROOKA, E.Y.; VIOTTI, N.M.A.; MAROCHI, M.A.; ISHII, K. & UENO, Y. Leucoencefalomalácia em eqüinos do norte do Paraná. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 223-227, jul/set., 1990.

HIROOKA, E.Y.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; YAMAGUCHI, M.M.; ANDRADE, J.B.; UENO, Y. *Fusarium moniliforme* e fumonisinas em rações envolvidas em intoxicação e contaminação natural em milho. **Anais do I Congresso Latino Americano de Micotoxinas - VIII Encontro Nacional de Micotoxinas**, Set. 26-30, 1994, Rio de Janeiro, Brasil, p. 87-90.

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**, Basingstoke, UK, v. 13, n. 2, p. 173-183, Feb./Mar., 1996.

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, DC, USA, v. 41, n. 3, p. 357-360, Mar., 1993a.

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, DC, USA, v. 41, n. 5, p. 764-767, May, 1993b.

HOPMANS, E.C. & MURPHY, P.A. Detection of fumonisins B1, B2, and B3 and hydrolysed fumonisin B1 in corn-containing foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, USA, v. 41, n. 10, p. 1655-1658, Oct., 1993.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Evaluation of carcinogenic risks to humans, IARC Monograph, Lyon, France. In: TRUCKSESS, M.W. General Referee Reports. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, USA, v. 77, n. 1, p. 135-142, Jan./Feb., 1994.

JACKSON, M.A. & BENNETT, G.A. Production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme* NRRL 13616 in submerged culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 56, n. 8, p. 2296-2298, Aug., 1990.

JACKSON, L.S.; HLYWKA, J.J.; SENTHIL, K.R.; BULLERMAN, L.B. & MUSSER, S.M. Effects of time, temperature, and pH on the stability of fumonisin B1 in an Aqueous model System. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, USA, v. 44, n. 3, p. 906-912, Mar., 1996.

JAVED, T.; BENNETT, G.A.; RICHARD, J.L.; DOMBRINK-KURTZMAN, M.A.; CÔTÉ, L.M. & BUCK, W.B. Mortality in broiler chicks on feed amended with *Fusarium proliferatum* culture material or with purified fumonisin B1 and moniliformin. **Mycopathologia**, Dordrecht, The Netherlands, v. 123, n. 3, p. 171-184, Sept., 1993a.

JAVED, T.; RICHARD, J.L.; BENNETT, G.A.; DOMBRINK-KURTZMAN, M.A.; BUNTE, R.M.; KOELKEBECK, K.W.; CÔTÉ, L.M.; LEEPER, R.W. & BUCK, W.B. Embryopatic and embryocidal effects of purified fumonisin B1 or *Fusarium moniliforme* culture material extract on chicken embryos. **Mycopathologia**, Dordrecht, The Netherlands, v. 123, n. 3, p. 185-193, Sept., 1993b.

JULIAN, A.M.; WAREING, P.W.; PHILLIPS, S.I.; MEDLOCK, V.F.; MACDONALD, M.V. & DEL RIO, L.E. Fungal contamination and selected mycotoxins in pre- and post-harvest maize in Honduras. **Mycopathologia**, Dordrecht, The Netherlands, v. 129, n. 1, p. 5-16, 1995 (abstract).

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

KING, S.B. & SCOTT, G.E. Genotypic differences in maize to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, St. Paul, USA, v. 71, n. 12, p. 1245-1247, Dec., 1981.

KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P.M.; MCEWEN, N.P.; LOMBAERT, G.A. & NG, W. Approaches to the risk assessment of fumonisins in corn-based foods in Canada. **Advance Experiments on Medicine and Biology**, v. 392, p. 369-393, 1996 (abstract).

LAURENT, D., PELLEGRIN, F., KOHLER, F.; COSTA, R., THEVENON, J., LAMBERT, C. & HUERRE, M. La fumonisine B1 dans la pathogénie de la leucoéncéphalomalacie équine. **Microbiologie-Aliments-Nutrition**, v. 7, p. 285-291, 1989.

LAURENT, D.; LANSON, M.; GOASDOUÉ, N.; KOHLER, F.; PELLEGRIN, F.; PLATZER, N. Étude en RMN 1H et 13C de la macrofusine, toxine isolée de maïs infesté par *Fusarium moniliforme* Sheld. **Analisis**, Paris, France, v. 18, n. 1, p. i72-i79, jan./fév., 1990.

LE BARS, J.; LE BARS, P.; DUPUY, J.; BOUDRA, H. & CASSINI, R. Biotic and abiotic factors in fumonisin B1 production and stability. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, USA, v. 77, n. 2, p. 517-521, Mar./Apr., 1994.

- LESLIE, J.F. Mating populations in *Giberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). **Phytopathology**, St. Paul, USA, v.81, n. 9, p. 1058-1060, Sept., 1991.
- 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*). **Mycotoxicology**, v. 82, n. 3, p. 341-345, 1992.
- LU, Z.; DANTZER, W.R.; HOPMANS, E.C.; PRISK, V.; CUNNICK, J.E.; MURPHY, P.A. & HENDRICH, S. Reaction with fructose detoxifies fumonisin B1 while stimulating liver-associated natural killer cell activity in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, USA, v. 45, n. 3, p. 803-809, Mar., 1997.
- MARAGOS, C.M. & RICHARD, J.L. Quantitation and stability of fumonisins B1 and B2 in milk. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, USA, v. 77, n. 5, p. 1162-1167, Sept./Oct., 1994.
- MARAGOS, C.M. Capillary zone electrophoresis and HPLC for the analysis of fluorescein isothiocyanate-labeled fumonisin B1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, USA, v. 43, n. 2, p. 390-394, Feb., 1995.
- MARAGOS, C.M.; BENNETT, G.A. & RICHARD, J.L. Analysis of fumonisin B1 in corn by capillary electrophoresis. **Advance Experiments on Medicine and Biology**, v. 392, p. 105-112, 1996 (abstract).
- MARASAS, W.F.O.; KELLERMAN, T.S.; PIENAAR, J.G. & NAUDÉ, T.W. Leukoencephalomalacia: a mycotoxicosis of equidae caused by *Fusarium moniliforme* Sheldon. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, South Africa, v. 43, n. 3, p. 113-122, 1976.
- MARASAS, W.F.O.; KRIEK, N.D.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, USA, v. 69, n. 11, p. 1181-1185, Nov., 1979.
- MARASAS, W.F.O.; KELLERMAN, T.S.; GELDERBLOM, W.C.A.; COETZER, J.A.W.; THIEL, P.G. & VAN DER LUGT, J.J. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, South Africa, v. 55, p. 197-203, 1988a.

MARASAS, W.F.O.; JASKIEWICZ, K.; VENTER, F.S. & VAN SCHALKWYK, D.J. *Fusarium moniliforme* contamination of maize in oesophageal cancer areas in Transkei. **South African Medical Journal**, Capetown, South Africa, v. 74, p. 110-114, August 1988b.

MEIRELES, M.C.A.; CORREA, B.; FISCHMAN, O.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. & FONSECA, H. Leucoencefalomalácia eqüina (LEME) no Brasil. II Aspectos microbiológicos e micotoxicológicos dos surtos ocorridos nos anos de 1988 e 1990. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 7, São Paulo, 1992. **Resumos**. Instituto Adolfo Lutz, 1992. p. 18.

MEIRELES, M.C.A. Leucoencefalomalácia eqüina (LEME) no Brasil: aspectos epizootiológicos, microbiológicos e toxicológicos. São Paulo: Curso de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia da Escola Paulista de Medicina, 1993. Tese de doutorado. 137p.

MEIRELES, M.C.A.; CORREA, 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, The Netherlands, **127**, 183 – 188, 1994.

MEISTER, U.; SYMMANK, H. & DAHLKE, H. Investigation and evaluation of fumonisin contamination of native and imported cereals. **Z lebensm Unters Forsch**, v. 203, n.6, p. 528-533, 1996 (abstract).

MERRILL, A.H., JR. Cell regulation by sphingosine and more complex sphingolipids. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, USA, v.23, n. 1, p. 83-104, Feb., 1991.

MERRILL, A.H., JR.; VAN ECHTEN, G.; WANG, E. & SANDHOFF, K. Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and *de novo* sphingolipid biosynthesis in cultured neurons *in situ*. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, USA, v. 268, n. 36, p. 27299-27306, Dec., 1993.

MILLER, J.D.; SAVARD, M.E.; SIBILIA, A. & RAPIOR, S. Production of fumonisins and fusarins by *Fusarium moniliforme* from Southeast Asia. **Mycologia**, Bronx, USA, v. 85, n. 3, p. 385-391, May/June, 1993.

MILLER, J.D.; SAVARD, M.E.; SCHAAFSMA, A.W.; SEIFERT, K.A. & REID, L.M. Mycotoxin production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from ontario and occurrence of fumonisin in the 1993 corn crop. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 17, n. 3, p. 233-239, 1995.

MIROCHA, C.J.; MACKINTOSH, C.G.; MIRZA, U.A.; XIE, W.; XU, Y. 7 CHEN, J. Occurrence of fumonisin in forage grass in New Zealand. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 58, n. 9, p. 3196-3198, Sept., 1992a.

MIROCHA, C.J.; GILCHRIST, D.G.; SHIER, W.T.; ABBAS, H.K.; WEN, Y. & VESONDER, R.F. AAL toxins, fumonisins (biology and chemistry) and host-specificity concepts. **Mycopathologia**, Dordrecht, The Netherlands, v. 117, n. 1/2, p. 47-56, Feb., 1992b.

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

MUKHOPADHYAY, T.; ROY, K.; COUTINHO, L.; RUPP, R.H. & GANGULI, B.N. Fumifungin, a new antifungal antibiotic from *Aspergillus fumigatus* Fresenius 1863. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, Japan, v. XL, n. 7, p. 1050-1052, July 1987.

MURPHY, P.A.; RICE, L.G. & ROSS, F.P. Fumonisin B1, B2 and B3 content of Iowa, Wisconsin and Illinois corn and corn screenings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, USA, v. 41, n. 2, p. 263-266, Feb., 1993.

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. **Advance Experiments on Medicine and Biology**, v. 392, p. 323-334, 1996 (abstract).

NELSON, P.E.; PLATTNER, R.D.; SHACKELFORD, D.D. & DESJARDINS, A.E. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 57, n. 8, p. 2410-2412, Aug., 1991.

NELSON, P.E.; PLATTNER, R.D.; SHACKELFORD, D.D. & DESJARDINS, A.E. Fumonisin B1 production by *Fusarium* species other than *Fusarium moniliforme* in section *Liseola* and by some related species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 58, n. 3, p. 984-989, Mar., 1992.

NELSON, P.E.; JUBA, J.H.; ROSS, P.F. & RICE, L.G. Fumonisin production by *Fusarium* species on solid substrates. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, USA, v. 77, n. 2, p. 522-524, Mar./Apr., 1994.

NORRED, W.P.; VOSS, K.A.; BACON, C.W. & RILEY, R.T. Effectiveness of ammonia treatment in detoxification of fumonisin-contaminated corn. **Food Chemistry and Toxicology**, Exeter, UK, v. 29, n. 12, p. 815-819, Dec., 1991a.

NORRED, W.P.; BACON, C.W.; PLATTNERR, R.D. & VESONDER, R.F. Differential cytotoxicity and mycotoxin content among isolates of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**, Dordrecht, The Netherlands, v. 115, n. 1, p. 37-43, July, 1991b.

NORRED, W.P.; PLATTNER, R.D.; VESONDER, R.F.; BACON, C.W. & VOSS, K.A. Effects of selected secondary metabolites of *Fusarium moniliforme* on unscheduled synthesis of DNA by rat primary hepatocytes. **Food Chemistry and Toxicology**, Exeter, UK, v. 30, n. 3, p. 233-237, Mar., 1992a.

NORRED, W.P.; WANG, E.; YOO, H.; RILEY, R.T. & MERRILL, A.H., JR. *In vitro* toxicology of fumonisins and the mechanistic implications. **Mycopathologia**, Dordrecht, The Netherlands, v. 117, n. 1/2, p. 73-78, Feb., 1992b.

NYVALL, R.F. & KOMMEDAHL, T. Saprophytism and survival of *Fusarium moniliforme* in corn stalks. **Phytopathology**, 60: 1233-1235, 1970. In: BACON, C.W. & WILLIAMSON, J.W. Interactions of *Fusarium moniliforme*, its metabolites and bacteria with corn. **Mycopathologia**, Dordrecht, The Netherlands, v. 117, n. 1/2, p. 65-71, Feb., 1992.

OSWEILER, G.D.; ROSS, P.F.; WILSON, T.M.; NELSON, P.E.; WITTE, S.T.; CARSON, T.L.; RICE, L.G. & NELSON, H.A. Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with fumonisin in corn screenings. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, USA, v. 4, p. 53-59, 1992.

OSWEILER, G.D.; KEHRLI, M.E.; STABEL, J.R.; THURSTON, J.R.; ROSS, P.F. & WILSON, T.M. Effects of fumonisin-contaminated corn screenings on growth and health of feeder calves. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v. 71, n. 2, p. 459-466, 1993.

PARK, D.L.; RUA, JR., S.M.; MIROCHA, C.J., ABD-ALLA, E.A.M. & WENG, C.Y. Mutagenic potentials of fumonisin contaminated corn following ammonia decontamination procedure. **Mycopathologia**, Dordrecht, The Netherlands, v. 117, n. 1/2, p. 105-108, Feb., 1992.

PATEL, S.; HAZEL, C.M.; WINTERTON, A.G. & GLEADLE, A.E. Surveillance of fumonisins in UK maize-based foods and other cereals. **Food Additives and Contaminants**, Basingstoke, UK, v. 14, n. 2, p. 187-191, Feb., 1997.

PESTKA, J.J.; AZCONZ-OLIVEIRA, J.I.; MAROVATSANGA, L.T. & ABOUZIED, M.M. Assessment Of Fumonisin In Foods By Immunochemical Methods. **106th AOAC International Annual Meeting**, Aug. 31 - Sept. 3, 1992, Cincinnati, Ohio, p. 143. In: RILEY, R.T.; NORRED, W.P. & BACON, C.W. Fungal toxins in foods: recent concerns. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, USA, v. 13, p. 167-189, 1993.

PESTKA, J.J.; AZCONA-OLIVEIRA, J.I.; PLATTNER, R.D.; MINERVINI, F.; DOKO, M.B. & VISCONTI, A. Comparative assessment of fumonisin in grain-based foods by ELISA, GC-MS, and HPLC. **Journal of Food Protection**, Ames, USA, v. 57, n. 2, p. 169-172, Feb., 1994.

PHILLIPS, T.D.; CLEMENT, B.A.; SARR, A.B.; HUANG, Z. & WILLIAMS, S.M. Chemiselective immobilization and detection of fumonisin B1. **VIII International Symposium Mycotoxins and Phycotoxins**, Nov. 8-11, 1992, Mexico City, Mexico, p.42 (Abstract).

PIÑEIRO, M.S.; SILVA, G.E.; SCOTT, P.M.; LAWRENCE, G.A. & STACK, M.E. Fumonisin levels in Uruguayan corn products. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, USA, v. 80, n. 4, p. 825-828, Jun-Aug., 1997.

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, DC, USA, v. 40, n. 8, p. 1352-1354, Aug., 1992.

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**, Bronx, USA, v. 82, n. 2, p. 698-702, Mar./Apr., 1990.

PLATTNER, R.D. & SHACKELFORD, D.D. Biosynthesis of labeled fumonisins in liquid cultures of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**, Dordrecht, The Netherlands, v. 117, n. 1/2, p. 17-22, Feb. 1992.

PLATTNER, R.D.; WEISLEDER, D.; SHACKELFORD, D.D.; PETERSON, R. & POWELL, R.G. A new fumonisin from solid cultures of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**, Dordrecht, The Netherlands, v. 117, n. 1/2, p. 23-28, Feb., 1992.

POZZI, C.R.; CORRÊA, B.; GAMBALE, W. PAULA, C.R.; CHACON-RECHE, N.O. & MEIRELLES, M.C.A. Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxin occurrence. **Food Additives and Contaminants**, Basingstoke, UK, v. 12, n. 3, p. 313-319, 1995.

QURESHI, M.A. & HAGLER, JR., W.M. Effect of fumonisin B1 exposure on chicken macrophage functions *in vitro*. **Poultry Science**, Champaign, USA, v. 71, n. 1, p. 104-112, Jan., 1992.

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 grown in Argentina. **Mycopathologia**, Dordrecht, The Netherlands, v. 135, p. 29-34, 1996.

RAPIOR, S.; MILLER, J.D.; SAVARD, M.E. & APSIMON, J.W. Production *in vitro* de fumonisines et de fusarines par des souches européennes de *Fusarium moniliforme*. **Microbiologie- Aliments- Nutrition**, v. 11, p. 327-333, 1993.

RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S. & VAN SCHALKWYK, D.J. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, St. Paul, USA, v. 82, n. 3, p. 353-357, Mar., 1992.

RICE, L.G. & ROSS, P.F. Methods for detection and quantitation of fumonisins in corn, cereal products and animal excreta. **Journal of Food Protection**, Ames, USA, v. 57, n. 6, p. 536-540, June, 1994.

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 the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, USA, v. 78, n. 4, p. 1002-1009, July/Aug., 1995.

RIET-CORREA, F.; MEIRELES, M.A.; SOARES, J.M.; MACHADO, J.J. & ZAMBRANO, A.F. Leucoencefalomalácia em eqüinos associada à ingestão de milho mofado. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, p. 27-30, 1982.

RILEY, R.T.; WANG, E. & MERRILL, A.H., JR. Liquid chromatographic determination of sphinganine and sphingosine: use of the free sphinganine-to-sphingosine ratio as a biomarker for consumption of fumonisins. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, USA, v. 77, n. 2, p. 533-540, Mar./April, 1992.

RILEY, R.T.; NORRED, W.P. & BACON, C.W. Fungal toxins in foods: recent concerns. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, USA, v. 13, p. 167-189, 1993.

ROMER, T. & MAUNE, C. A practical approach to mycotoxin quality control. **Cereal Foods World**, Minneapolis, USA, v. 38, n. 5, p. 349-352, May, 1993.

ROSS, P.F.; NELSON, P.E., RICHARD, J.L.; OSWEILER, G.D.; RICE, L.G.; PLATTNER, R.D. & WILSON, T.M. Production of fumonisin by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 56, n. 10, p. 3225-3226, Oct., 1990.

ROSS, P.F.; RICE, L.G.; REAGOR, J.C.; OSWEILER, G.D.; WILSON, T.M.; NELSON, H.A.; OWENS, D.L.; PLATTNER, R.D.; HARLIN, K.A.; RICHARD, J.L.; COLVIN, B.M. & BANTON, M.I. Fumonisin B1 concentrations in feeds from 45 confirmed equine leukoencephalomalacia. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, USA, v. 3, p. 238-241, 1991a.

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, The Netherlands, v. 114, n. 3, p. 129-135, June, 1991b.

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, The Netherlands, v. 117, n. 1/2, p. 109-114, Feb., 1992.

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 Diagnostic Investigation**, Columbia, USA, v. 4, p. 326-329, 1992.

RUMBEIHA, W.K. & OEHME, F.W. Fumonisin exposure to Kansas through consumption of corn-based market foods. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, USA, v. 39, n. 4, p. 220-225, Aug., 1997.

SALA, N.; SANCHIS, V.; VILARO, P.; VILADRICH, R.; TORRES, M.; VIÑAS, I. & CANELA, R. Fumonisin producing capacity of *Fusarium* strains isolated from cereals in Spain. **Journal of Food Protection**, Ames, USA, v. 57, n. 10, p. 915-917, Oct., 1994.

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, DC, USA, v. 60, n. 6, p. 2147-2148, June, 1994.

SANHUEZA, P.C.E. & RESNIK, S.L. Coocurrencia natural de fumonisinas, aflatoxinas y zearalenona en maiz argentino. **X Seminário Latinoamericano y del Caribe de Ciência y Tecnologia de los Alimentos**, Sept. 17-20, 1997, Buenos Aires, Argentina (abstract 5-1).

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, DC, USA, v. 43, n. 9, p. 2548-2552, Sept., 1995.

SCHROEDER, J.J.; CRANE, H.M.; XIA, J.; LIOTTA, D.C. & MERRILL, JR., A.H. Disruption of sphingolipid metabolism and stimulation of DNA synthesis by fumonisin B1. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, USA, v. 269, n. 5, p. 3475-3481, Feb., 1994.

SCOTT, G.E. & KING, S.B. Site of action of factors for resistance to *Fusarium moniliforme* in maize. **Plant Disease**, St. Paul, USA, v. 68, n. 9, p. 804-806, Sept., 1984.

SCOTT, P.M. & LAURENCE, G.A. Liquid chromatography determination of fumonisins with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, USA, v. 75, n. 5, p. 829-834, Sept./Oct., 1992.

SCOTT, P.M. Fumonisin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, The Netherlands, v. 18, n. 4, p. 257-270, June, 1993.

SCOTT, P.M. & LAURENCE, G.A. Stability and problems in recovery of fumonisins added to corn-based foods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, USA, v. 77, n. 2, p. 541-545, Mar./Apr., 1994.

SCOTT, P.M.; DELGADO, T.; PRELUSKY, H.L.; TRENHOLM, H.L. & MILLER, J.D. Determination of fumonisin in milk. **Journal of Environmental and Science Health**, New York, USA, v. B29, n. 5, p. 989-998, 1994.

SCOTT, P.M. & TRUCKSESS, M.W. Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, USA, v. 80, n. 5, p. 941-949, Sept./Oct., 1997.

SHELBY, R.A. Differential fumonisin production in maize hybrids. **Plant Disease**, St. Paul, USA, v. 78, n. 6, p. 582-584, 1994.

SHELBY, R.A.; ROTTINGHAUS, G.E. & MINOR, H.C. Comparison of thin-layer chromatography and competitive immunoassay methods for detecting fumonisin on maize. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, USA, v. 42, n. 9, p. 2064-2067, Sept., 1994.

SHEPHARD, G.S.; SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G. & GELDERBLOM, W.C.A. Quantitative determination of fumonisins B1 and B2 by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, New York, USA, v. 13, n. 10, p. 2077-2087, 1990.

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, The Netherlands, v. 574, n. 2, p. 299-304, Feb., 1992.

SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W.; VLEGGAAR, R. & ALBERTS, J.F. Determination of the mycotoxin fumonisin B1 and identification of its partially hydrolysed metabolites in the faeces of non-human primates. **Food Chemistry and Toxicology**, Exeter, USA, v. 32, n. 1, p. 23-29, Jan., 1994a.

SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W.; ALBERTS, J.F. & CAWOOD, M.E. Distribution and excretion of a single dose of the mycotoxin fumonisin B1 in a non-human primate. **Toxicon**, London, UK, v. 32, n. 6, p. 735-741, 1994b.

SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; STOCKENSTRÖM, S. & SYDENHAM, E.W. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, USA, v. 79, n. 3, p. 671-687, May/June, 1996.

SHETTY, P.H. & BLAT, 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, DC, USA, v. 45, n. 6, p. 2170-2173, June, 1997.

SHIER, W.T.; ABBAS, H.K. & MIROCHA, C.J. Toxicity of the mycotoxins fumonisins B1 and B2 and *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxin (AAL) in cultured mammalian cells. **Mycopathologia**, Dordrecht, The Netherlands, v. 116, p. 97-104, 1991.

SILER, D.J. & GILCHRIST, D.G. Determination of host-selective phytotoxins from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* as their maleyl derivatives by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography, Amsterdam, The Netherlands**, v. 238, n. 1, p. 167-173, April, 1982.

SILER, D.J. & GILCHRIST, D.G. Properties of host specific toxins produced by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* in culture and in tomato plants. **Physiological Plant Pathology**, London, UK, v. 23, p. 265-274, 1983.

STACK, M.E. & EPPLEY, R.M. Liquid chromatographic determination of fumonisins B1 and B2 in corn and corn products. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, USA, v. 75, n. 5, p. 834-837, Sept./Oct., 1992.

STOCKENSTRÖM, S.; SYDENHAM, E.W. & THIEL, P.G. Determination of fumonisins in corn: evaluation of two purification procedures. **Mycotoxin Research**, Mainz, Germany, v. 10, p. 9-14, 1994.

SUTIKNO; ABOUZIED, M.M.; AZCONA-OLIVERA, J.I.; PATRICK HART, L. & PESTKA, J.J. Detection of fumonisins in *Fusarium* cultures, corn, and corn products by polyclonal antibody-based ELISA: relation to fumonisin B1 by liquid chromatography. **Journal of Food Protection**, Ames, USA, v. 59, n. 6, p. 645-651, June, 1996.

SYDENHAM, E.W.; GELDERBLOM, W.C.A.; THIEL, P.G. & MARASAS, W.F.O. Evidence for natural occurrence of fumonisin B1, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, USA, v. 38, n. 1, p. 285-290, Jan., 1990a.

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, DC, USA, V. 38, n. 10, p. 1900-1903, Oct., 1990b.

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, DC, USA, v. 39, n.11, p. 2014-2018, Nov., 1991.

SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S. & THIEL, P.G. Liquid chromatographic determination of fumonisins B1, B2 and B3 in foods and feeds. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, USA, v. 75, n. 2, p. 313-318, Mar./Apr., 1992a.

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, DC, USA, v. 40, n. 6, p. 994-997, June, 1992b.

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, DC, USA, v. 41, n. 6, p. 891-895, June, 1993.

SYDENHAM, E.W.; VAN DER WESTHUIZEN, L.; STOCKENSTRÖM, S.; SHEPHARD, G. S. & THIEL, P.G. Fumonisin-contaminated maize: physical treatment for the partial decontamination of bulk shipments. **Food Additives and Contaminants**, Basingstoke, UK, v. 11, n. 1, p. 25-32, Jan./Feb., 1994.

SYDENHAM, E.W.; STOCKENSTRÖM, S.; THIEL, P.G.; SHEPARRD, 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, DC, USA, v. 43, n. 5, p. 1198-1201, May, 1995.

SYDENHAM, E.W.; 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 the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, USA, v. 79, n. 3, p. 688-696, May/June, 1996.

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, DC, USA, v. 44, n. 1, p. 159-164, Jan., 1996.

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**, Ames, USA, v. 58, n. 6, p. 666-672, June, 1995.

THIEL, P.G.; SHEPHARD, G.S.; SYDENHAM, E.W.; MARASAS, W.F.O.; NELSON, P.E. & WILSON, T.M. Levels of fumonisins B1 and B2 in feeds associated with confirmed cases of equine leukoencephalomalacia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, USA, v. 39, n. 1, p. 109-111, Jan., 1991a.

THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S.; GELDERBLOM, W.C.A. & NIEUWENHUIS, J.J. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, USA, v. 57, n. 4, p. 1089-1093, April, 1991b.

THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W.; SHEPHARD, G.S. & VAN SCHALKWYK, D.J. Study of reproducibility characteristics of a liquid chromatographic method for the determination of fumonisins B1 and B2 in corn: IUPAC collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, USA, v. 76, n. 2, p. 361-366, Mar./Apr., 1993.

TRUCKSESS, M.W.; STACK, M.E.; ALLEN, S. & BARRION, N. Immunoaffinity column coupled with liquid chromatography for determination of fumonisin B1 in canned and frozen sweet corn. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, USA, v. 78, n. 3, p. 705-710, May/June, 1995.

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

USLEBER, E.; STRAKA, M. & TERPLAN, G. Enzyme immunoassay for fumonisin B1 applied to corn-based food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, USA, v. 42, n. 6, p. 1392-1396, June, 1994.

USLEBER, E.; SCHLICHOTHERLE, C.; LAKNER, M. & MÄRTLBAUER, E. Occurrence of fumonisins in foods in Germany. **IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**, May 27-31, Rome, Italy, 1996.

VANMIDDLES WORTH, F.; GIACOBBE, R.A.; LOPEZ, M.; GARRITY, G.; BLAND, J.A.; BARTIZAL, K.; FROMTLING, R.A.; POLISHOOK, J.; ZWEERINK, M.; EDISON, A.M.; ROZDILSKY, W.; WILSON, K.E. & MONAGHAN, R.L. Sphingofungins A, B, C, and D: a new family of antifungal agents I. Fermentation, isolation, and biological activity. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, Japan, v. 45, n. 6, p. 861-867, 1992a.

VANMIDDLES WORTH, F.; DUFRESNE, C.; WINCOTT, F.E.; MOSLEY, R.T. & WILSON, K.E. Determination of the relative and absolute stereochemistry of sphingofungins A, B, C, and D. **Tetrahedron Letters**, Oxford, UK, v. 33, n. 3, p. 297-300, Jan., 1992b.

VAN RENSBURG, S.J. Recent studies on the etiology of oesophageal cancer. **South African Cancer Bulletin**, v.29, p. 22-31, 1985. In: NORRED, W.P. Fumonisin - mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Bristol, USA, v. 38, p. 309-328, 1993.

VELÁSQUEZ, C.; VAN BLOEMENDAL, C.; SANCHIS, V. & CANELA, R. Derivation of fumonisins B1 and B2 with 6-aminoquinolyl N-hydroxysuccinimidylcarbamate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, USA, v. 43, n. 6, p. 1535-1537, June, 1995.

VESONDER, R.; PETERSON, R.; PLATTNER, R. & WEISLEDER, D. Fumonisin B1: isolation from corn culture, and purification by high performance liquid chromatography. **Mycotoxin Research**, Mainz, Germany, v. 6, p. 85-88, 1990.

VESONDER, R.F.; LABEDA, D.P. & PETERSON, R.E. Phytotoxic activity of selected water-soluble metabolites of *Fusarium* against *Lemna minor* L. (Duckweed). **Mycopathologia**, Dordrecht, The Netherlands, v. 118, n. 3, p. 185-189, June, 1992.

VIQUEZ, O.M.; CASTELL-PEREZ, M.E. & SHELBY, R. A. Occurrence of fumonisin B1 in maize grown in Costa Rica. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, USA, v. 44, n. 9, p. 2789-2791, Sept., 1996.

VISCONTI, A. & DOKO, M.B. Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, USA, v. 77, n. 2, p. 546-550, Mar./Apr., 1994.

VISCONTI, A.; DOKO, M.B.; BOTTALICO, C.; SCHURER, B. & BOENKE, A. Stability of fumonisins (FB1 and FB2) in solution. **Food Additives and Contaminants**, Basingstoke, UK, v. 11, n. 4, p. 427-431, July/Aug., 1994.

VOSS, K.A.; NORRED, W.P.; PLATTNER, R.D. & BACON, C.W. Hepatotoxicity and renal toxicity in rats of corn samples associated with field cases of equine leukoencephalomalacia. **Food Chemistry and Toxicology**, Exeter, UK, v. 27, n. 2, p. 89-96, Feb., 1989.

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, The Netherlands, v.112, n. 2, p. 81-92, Nov., 1990.

VOSS, K.A.; RILEY, R.T.; BACON, C.W.; CHAMBERLAIN, W.J.; NORRED, W.P. Subchronic toxic effects of *Fusarium moniliforme* and Fumonisin B1 in rats and mice. **Natural Toxins**, New York, E.U.A, v. 4, p. 16 – 23 , 1996.

WANG, E.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; RILEY, R.T. & MERRILL, JR, A.H. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, USA, v. 266, n. 22, p. 14486-14490, Aug., 1991.

WANG, E.; ROSS, P.F.; WILSON, T.M.; RILEY, R.T. & MERRILL, A.H., JR. Increases in serum sphingosine and sphinganine and decreases in complex sphingolipids in ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, USA, v. 122, p. 1706-1716, 1992.

WARE, G.M.; FRANCIS, O.; KUAN, S.S.; UMRIGAR, P.; CARMAN, A.; CARTER, L. & BENNETT, G.A. Determination of fumonisin B1 in corn by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytical Letters**, New York, USA, v. 26, n. 8, p. 1751-1770, 1993.

WEIBKING, T.S.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; TURK, J.R. & ROTTINGHAUS, G.E. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B1, on the young broiler chick. **Poultry Science**, Champaign, USA, v. 72, n. 3, p. 456-466, Mar., 1993a.

WEIBKING, T.S.; LEDOUX, D.R.; BROWN, T.P.; ROTTINGHAUS, G.E. Fumonisin toxicity in turkey poults. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, USA, v. 5, p. 75-83, 1993b.

WILSON, B.J.; MARONPOT, R.R. & HILDEBRANDT, P.K. Equine leukoencephalomalacia. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 163, n. 11, p. 1293-1294, 1973.

WILSON, T.M.; ROSS, P.F.; RICE, L.G.; OSWEILER, G.D.; NELSON, H.A.; OWENS, D.L.; PLATTNER, R.D.; REGGIARDO, C.; NOON, T.H. & PICKRELL, J.W. Fumonisin B1 levels associated with an epizootic of equine leukoencephalomalacia. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, USA, v. 2, P. 213-216, 1990.

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. **Mycopathologia**, Dordrecht, The Netherlands, v. 117, n. 1/2, p. 115-120, Feb., 1992.

XAVIER, J.G.; BRUNNER, C.H.M.; SAKAMOTO, M.; CORREA, B.; FERNANDES, W.E. & DIAS, J.L.C. Equine leukoencephalomalacia: Report of five cases. **Brazilian Journal of Veterinary and Research of Animal Science**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 185-189, 1991.

YAMAGUSHI, M.M.; HIROOKA, E.Y.; SHIBATA, T.M.M.; HASSEGAWA, R.H.; AOYAMA, S.; SUGIURA, T. & UENO, Y. Fumonisin em milho do Estado do Paraná. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 7, São Paulo, 1992. **Resumos**. Instituto Adolfo Lutz, 1992. p. 27.

YANG, C.S. Research on esophageal cancer in China: a review. **Cancer Research**, Chicago, USA, v. 40, p. 2633-2644, Aug., 1980.

YOO, H-S.; NORRED, W.P.; WANG, E.; MERRILL, JR., A.H. & RILEY, R.T. Fumonisin inhibition of *de novo* sphingolipid biosynthesis and cytotoxicity are correlated in LLC-PK₁ cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, USA, v. 114, p. 9-15, 1992.

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, DC, USA, v. 60, n. 5, p. 1626-1629, May, 1994.

YOSHIZAWA, T.; YAMASHITA, A. & CHOKETHAWORN, N. Occurrence of fumonisins and aflatoxins in corn from Thailand. **Food Additives and Contaminants**, Basingstoke, UK, v. 13, n. 2, p. 163-168, Feb./Mar., 1996.

ZOLLER, O.; SAGER, F. & ZIMMERLI, B. [Occurrence of fumonisins in foods]. **Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.**, v. 85, p. 81-99, 1994.

Fumonisin levels in commercial corn products in Buenos Aires, Argentina

Abstract

Fumonisin B1 (FB1) and B2 (FB2) were determined in 35 samples of corn flour and corn grits destined for human consumption and purchased directly from Buenos Aires food shops and supermarkets from October 1996 to January 1997 and during the month of January 1998. During the first period of sample collecting, 16 out of 19 samples were found to be contaminated. Considering all 19 samples contamination levels were between not detected and 1860 ng/g FB1, with an average of 300 ng/g, and from not detected to 768 ng/g FB2, with an average of 95 ng/g. During the second period all 16 samples were found to be contaminated with levels ranging from 75 to 4987 ng/g FB1, with an average of 844 ng/g, and from not detected to 1818 ng/g FB2, with an average of 304 ng/g. The levels of FB1 and FB2 in the samples collected during January 1998 were significantly higher than the samples collected during the period from October 1996 to January 1997. No significant difference was found in terms of fumonisin levels between the branded and unbranded samples.

Keywords: fumonisins, corn, corn products

Introduction

Fumonisin are toxic metabolites produced mainly by *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum*, and frequently contaminate corn and corn products (Shepard et alii, 1996). Fumonisin B1 causes equine leukoencephalomalacia (Ross et alii 1990) and porcine pulmonary edema (Harrison et alii 1990). It has been shown to be hepatocarcinogenic to rats (Gelderblom et alii 1991) and to cause brain haemorrhage in rabbits (Bucci et alii, 1996). A high incidence of human oesophageal cancer in areas such as Transkei, in South Africa (Sydenham et alii 1990) and Linxian Province, in China (Chu and Li, 1994), have been correlated with the presence of fumonisins in foods ingested by the local population. The biological effects of the fumonisins result from their ability to alter sphingolipid metabolism. They are potent inhibitors of key enzymes involved in the formation and turnover of sphingosine-based lipids, which, in turn, are involved in multiple structural and regulatory aspects of cell functioning (Wang et alii 1991).

There are few reports to date about fumonisins in Argentinian corn. Seventeen samples of field trial corn from the Province of Buenos Aires were shown to contain FB1 (1110 to 6695 ng/g), FB2 (325 to 2680 ng/g), and FB3 (110 to 855 ng/g) (Sydenham et alii, 1993). All fifty samples of commercial corn hybrids from the Province of Cordoba were found to be positive for fumonisins, with levels ranging from 185 to 27,050 ng/g FB1 and from 40 to 9950 ng/g FB2 (Ramirez et alii, 1996).

The mycological data available, although scant, also provides valuable information on the subject. *Fusarium* was the prevailing genus and *F. moniliforme* was the most frequently isolated species in 178 corn samples from three Argentinian main production areas (Gonzalez et alii, 1995). In another survey all fifteen strains of *F. moniliforme* and *F. proliferatum*, isolated from field trial corn in Buenos Aires Province, produced fumonisins (Sydenham et alii, 1993). These results indicated the need for data on contamination of corn and corn destined for human consumption in Argentina. . Based on the international data available, it has been observed (Bullerman, 1996) that those corn products receiving less processing, such as corn grits, corn meal, and corn flour, are the ones exhibiting higher fumonisin levels. The opposite seems to hold for the more highly processed corn foods. The present paper reports the results of a pilot survey on the incidence of fumonisins in two commercial corn products, corn grits and corn flour, available on the market in Buenos Aires, Argentina.

Experimental

Corn flour (28 samples) and corn grits (6 samples) were purchased in 1 kg amounts from food shops and supermarkets in Buenos Aires, Argentina. Samples were first purchased from October 1996 to January 1997 (19 samples), and a second group (15 samples) was acquired during January 1998. The corn grit samples were ground to a uniform consistency (particle size < 1mm). All samples were well mixed by hand before analysis. The AOAC Method 995.15 (AOAC Int., 1997, sec 49.10.03) was employed with minor modifications for the determination of fumonisins B1 and B2. Sub samples of 25 g were extracted with methanol-water (1+1) and submitted to a cleanup using a strong anion-exchange cartridge (500 mg, Supelclean LC-SAX, Supelco) preconditioned with methanol, followed by methanol-water. The fumonisins were eluted with acetic acid-methanol (1+ 99). The eluted fraction was evaporated under nitrogen. The dried residue was then derivatized with o-phthalaldehyde (OPA). The derivatives were analysed by HPLC with a fluorescence detector (Shimadzu, models LC-10A pumps, EZ Chrom data system, and FR-551 fluorescence detector), Lichrocart column C-8, 5 μ m particles, 125 x 4 mm i.d., oven temperature of 35°C, with excitation and emission wavelengths of 335 nm and 440 nm, respectively. The mobile phase was methanol / disodium hydrogen phosphate 0.05 M (65+35:v/v), adjusted with o-phosphoric acid to pH 3.35, at 1.8 mL/min. Fumonisin standards (Sigma) were employed for quantification. A recovery test was conducted at four levels on quadruplicates of spiked ground corn: 125, 250, 500 and 1000 ng/g for FB1 and FB2. The recoveries ranged from 62 to 78%, with an average of 68 ± 2 , for FB1, and from 77 to 98%, with an average of 86 ± 5 , for FB2. The relative standard deviations were always less than 12% for FB1 and less than 8% for FB2. The detection limits were 11 ng/g for FB1 and FB2. The Behreus-Fisher t-test (one tail, two-samples assuming unequal variance) was used to determine the differences between the mean levels of FB1, FB2, and FB1 + FB2.

Results and Discussion

Sixteen out of 19 samples were to be contaminated with fumonisins at levels ranging from 38 to 1860 ng/g for FB1 and from 20 to 768 ng/g for FB2 (Table 1) during the first sampling period (October 1996 to January 1997). All 16 samples were found to be contaminated at levels between 75 and 4987 ng/g for FB1 and between not detected and 1818 ng/g for FB2 (Table 2) during the second sampling period. One out of two samples of corn flour destined for infant feeding was found to be contaminated with fumonisins (Table 2). A comparison of means was conducted in order to verify if any significant difference existed between the fumonisin levels found during the two sampling periods. The Behreus – Fisher one tail t-test showed that the levels of FB1, FB2, and FB1 + FB2 were significantly ($P>0.05$) higher for the January 1998 samples than for the samples from the October 1996 to January 1997 period. . No significant difference was found in terms of fumonisin levels between the branded (27 samples) and the unbranded samples (7 samples).

Corn flour is used in Argentina mostly for preparing polenta while corn grits may have more diversified uses. An average the levels of fumonisins found during the present survey are within the levels reported for corn grits, corn meal and corn flour in South Africa (Sydenham et alii, 1991), Switzerland (Pittet et alii, 1992) and the United States (Pohland, 1996). These countries have so far conducted the most extensive surveys on these types of product. Values reported from other surveys, but involving fewer samples, from Spain (Sanchis et alii, 1994), Italy (Doko and Visconti, 1994), Germany (Usleber et alii, 1994), and Uruguay (Piñeiro et alii, 1997), also fall within the same range for the same type of commodity. However the upper values in the Argentinian corn grits and corn flour (4.99 $\mu\text{g/g}$ FB1 and 1.82 $\mu\text{g/g}$ FB2) (Table 2) are higher than the upper values reported for these products in Switzerland (0.79 $\mu\text{g/g}$ FB1 and 0.16 $\mu\text{g/g}$ FB2, Pittet et alii, 1992), the US (no values above 1.0 $\mu\text{g/g}$, Pohland, 1996), and South Africa (0.48 $\mu\text{g/g}$ FB1 and 0.12 $\mu\text{g/g}$ FB2, Sydenham et alii, 1991). In terms of incidence of contaminated samples, the results from the present work (91% of samples contaminated with FB1 and 79 % with FB2) rank higher than these from Switzerland (58% for FB1 and 21% for FB2, as calculated by Pittet et alii, 1992) and South Africa (80% FB1 and 21% FB2, as calculated from Sydenham et alii, 1991) and closer to these from the United States (87 to 100% for total fumonisins, as calculated by Pohland, 1996), for the same products.

Considering the toxicological implications of these toxins and the fact that in Argentina, corn is eaten at an average of 259 g/day after the age of 6 (Farcochi et el. 1996), the contamination found indicates the need for routinely screening corn-based foods in order to access and minimize the risk to the population.

Acknowledgements

A fellowship to the first author from CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil - is gratefully acknowledged. We thank Xenobióticos Laboratory S.A. Argentina for their sponsorship.

References

- AOAC INTERNATIONAL, 1997, Official Methods of Analysis of AOAC International, edited by P. Cunniff (Gaithersburg: AOAC International), chapter 49, pp. 1-51.
- BUCCI, T.; HANSEN, D.K.; LABORDE, J.B. , 1996. Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin Fumonisin B1. *Natural toxins* 4, 51 – 51.
- BULLERMAN, L.B., 1996. Occurrence of Fusarium and fumonisins on Food grains and in foods, in Jackson, L.S., DeVries, J.W., and Bullerman, L.B (eds), *Fumonisin in food*, Plenum Press, New York, p. 27 - 38.
- CHU, F.S. and LI, G.Y. 1994. Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People' Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 847-852.
- DOKO, M.B., and VISCONTI, A ., 1994. Occurrence of fumonisins B1 and B2 in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. *Food Additives and Contaminants*, 11, 433 – 439.
- FARCOCHI, M.C., DALCERO, A, PASCALE, M., VISCONTI, A. and CHULZE, S. 1996 Occurrence of fumonisins in sweet corn and corn-based human foodstuffs in Argentina. Proceedings of the 9th International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Rome, 1996, pp 159.
- GELDERBLOM, W.C.A., KRIEKE, N.P.J., MARASAS, W.F.O, AND THIEL, P.G. 1991. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats. *Carcinogenesis*, 12, 1247 - 1251.
- GONZÁLEZ, H.H.L., RESNIK, S.L., BOCA, R.T., MARASAS, W.F.O., 1995, Mycoflora of Argentinian corn harvested in the main production area in 1990. *Mycopathologia*, 130, 29 - 36.

- HARRISON, L.R., COLVIN, B., GREENE, J.T., NEWMAN, L.E. AND COLE Jr, J.R.. 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *Journal of Veterinary and Diagnostic Investigations*, **2**, 217 - 221.
- PIÑEIRO, M.S., SILVA, G.E., SCOTT, P.M., LAWRENCE, G.A ., and STACK, M.E., 1997. Fumonisin levels in Uruguayan corn products. *Journal of the AOAC International*, **80**, 825 – 828.
- PITTET, A ., PARISOD. V., and SCHELLENBERG, M., 1992. Occurrence of fumonisins B1 and B2 in corn-based products from the Swiss market, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**, 1352 – 1354.
- POHLAND, A .E., 1996. Occurrence of fumonisins in the U.S. food supply, in Jackson, L.S., DeVries, J.W., and Bullerman, L.B (eds), *Fumonisin in food*, Plenum Press, New York, p. 19 – 55.
- RAMIREZ, M.L., PASCALE, M., CHULZE, S., REYNOSOS, M.M., MARCH, G. and VISCONTI, A., 1996. Natural occurrence of fumonisins and their correlation to *Fusarium* contamination in commercial corn hybrids grown in Argentina. *Mycopathology*, **135**, 29 - 34.
- ROSS, P.F., NELSON, P.E., RICHARD, J.L., OSWEILER, G.D., RICE, L.G., PLATTNER, R.D., AND WILSON, T.M. 1990. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. *Applied Environmental Microbiology*, **56**, 3225 - 3226.
- SYDENHAM, E.W., SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O . and STOCKENSTRÖM, S. 1991. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39**, 2014 – 2018.
- SYDENHAM, E.W., THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O., SHEPHARD, G.S., VAN SCHALKWYK, D.J. and KOCH, K.R. 1990. 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*, **38**, 1900 - 1903.
- SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., STOCKENSTRÖM, S. and SYDENHAM, E.W. 1996. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, **79**, 671 - 687.

SYDENHAM, E.W., SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O., RHEEDER, J.P., PERALTA SANHUEZA, C.E., GONZALEZ, H.H.L., RESNIK, S.L. 1993. Fumonisin in Argentinian field-trial corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **41**, 891-895.

USLEBER, E., STRAKA, M, and TERPOLAN, G. 1994. Enzyme immunoassay for fumonisin B1 applied to corn-based food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42**, 1392 – 1396.

WANG, E., NORRED, W.P., BACON, C.W., RILEY, R.T. AND MERRILL Jr, A.H. 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**, 14486-14490.

Table 1. Fumonisin B1 and B2 in commercial corn products in Buenos Aires, Argentina, during the period October 1996/ January 1997.

Type of product	Sample	Fumonisin levels (ng/g)	
		FB1	FB2
Corn flour	1	54	nd
	2	485	147
	3	590	176
	4	662	182
	5	601	196
	6	52	nd
	7	68	20
	8	95	30
	9	38	nd
	10	116	33
	11	175	48
	12	123	37
	13	1860	768
	14	195	53
Corn flour (baby cereal)	15	nd	nd
Corn grits	16	494	100
	17	nd	nd
	18	nd	nd
	19	92	20
Mean levels ± SD	19 ^a	300±441	95±177

nd - not detected (< 11 ng/g for FB1 or FB2)

^a – total number of samples for the period.

Table 2. Fumonisin B1 and B2 in commercial corn products in Buenos Aires, Argentina, during January 1998.

Type of product	Sample	Fumonisin levels (ng/g)	
		FB1	FB2
Corn flour			
	1	75	15
	2	1072	412
	3	114	16
	4	351	126
	5	4987	1818
	6	625	185
	7	68	20
	8	1178	252
	9	1545	750
	10	346	89
	11	1102	384
	12	327	81
	13	112	nd
Corn flour (baby cereal)			
	14	447	158
Corn grits			
	15	322	226
	16	832	324
Mean levels ± SD	16 ^a	844±1194	304±449

nd - not detected (< 11 ng/g for FB1 or FB2)

^a – total number of samples for the period.

Incidence of fumonisins in maize genotypes grown in Argentina during two consecutive seasons

Abstract

The natural occurrence of fumonisin B1 (FB1) and fumonisin B2 (FB2) has been investigated in 37 full cycle hybrids and 29 intermediate cycle hybrids grown in Junin, and 42 full cycle hybrids and 32 intermediate cycle hybrids grown in Pergamino during the growing season of October 1995 to April 1996 and the growing season of October 1996 to April 1997, respectively. The maize hybrids grown in Junin during the first season contained fumonisin B1 at levels ranging from not detected to 838 ng/g (mean concentration 131 ng/g) for intermediate cycle maize hybrids and from not detected to 662 ng/g for FB2 (mean concentration 58 ng/g). Fumonisins B1 and B2 ranged from not detected to 470 ng/g for FB1 (mean concentration of 62 ng/g) and from not detected to 138 ng/g for FB2 (mean concentration of 13 ng/g) for full cycle maize hybrids. The maize hybrids grown in Pergamino during the second season contained fumonisins B1 and B2 at levels ranging from 66 to 11160 ng/g for FB1 (mean concentration of 3183 ng/g) and from 27 to 3526 ng/g for FB2 (mean concentration of 995 ng/g) for intermediate cycle maize hybrids. The levels of contamination ranged from 499 to 10791 ng/g for FB1 (mean concentration of 3846 ng/g) and from 87 to 4597 ng/g for FB2 (mean concentration of 1166 ng/g) for full cycle maize hybrids. Forty four of the corn hybrids were planted during both growing seasons. No correlation was found between fumonisins levels and endosperm type, number of crosses of the hybrid, and vegetative cycle length. The fumonisins levels were significantly different from one growing season to the other as was the average monthly relative humidity but not the average monthly temperature and the total monthly rainfall.

Keywords: Fumonisins; corn; Argentina

INTRODUCTION

Fumonisin are toxic metabolites produced mainly by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. nygami* (Nelson et alii, 1993; Musser & Plattner, 1997). *F. moniliforme* and *F. proliferatum* are believed to have a frequency of simultaneous occurrence of 90% or higher in maize (Bacon & Nelson, 1994). The occurrence of fumonisins in maize and maize-based feeds has been associated with mycotoxicosis in animals, such as equine leukoencephalomalacia (Ross et alii 1990) and porcine pulmonary edema (Harrison et alii 1990). Fumonisin B1 has been shown to be hepatocarcinogenic to rats (Gelderblom et alii 1991) and to cause brain hemorrhage in rabbits (Bucci et alii, 1996). Fumonisin appear to be endemic in corn and has been detected in a wide array of corn-based products (Shephard et alii 1996; Scott, 1993). In addition, the high incidence of human esophageal cancer in certain parts of the world, such as in Transkei, South Africa (Sydenham et alii 1990), and in Linxian, China (Chu and Li, 1994), has been correlated with higher levels of fumonisins in the food consumed locally.

Corn or maize (*Zea mays* L.), ranks third among the world cereal crops, after wheat and rice. The United States leads with nearly 40% of the total world production and is followed by the People's Republic of China and Brazil (Poehlman & Sleper, 1995). Argentina contributes with 2 percent of the total world production. Maize occupies one third of the cultivated area of the country and ranks third among cereals, after soybean and wheat. About 50% of Argentinean maize is destined to export markets, mainly to Asian countries and Brazil (Pizzarro, 1996; Muñoz, 1996).

There are few reports to date about fumonisins in Argentinian maize. Seventeen samples of field trial corn from the Province of Buenos Aires were shown to contain FB1 (1110 to 6695 ng/g), FB2 (325 to 2680 ng/g), and FB3 (110 to 855 ng/g) (Sydenham et alii, 1993). Fifty commercial maize hybrids from the Province of Cordoba were analyzed for fumonisins. All were positive and contamination ranged from 185 to 27,050 ng/g for FB1 and from 40 to 9950 ng/g for FB2 (Ramirez et alii, 1996). On the other hand the mycological data available, although also scant, has helped to give an overview of the problem. The mycoflora of 178 samples of corn from Argentina three main production areas showed that the genus *Fusarium* prevailed and that *F. moniliforme* was its most frequently isolated species (Gonzalez et alii, 1995). In addition to that, all fifteen strains of *F. moniliforme* and *F. proliferatum* isolated from field trial corn samples (Buenos Aires Province) produced fumonisins (Sydenham et alii, 1993).

One approach in preventing fumonisin contamination in maize would be to find genotypes which are resistant to *F. moniliforme* or *F. proliferatum* or not susceptible to fumonisin formation. King and Scott (1981) demonstrated that maize genotypes differ significantly in the proportion of healthy-

looking kernels that, nevertheless, harbor *F. moniliforme* and that these differences are under genetic control. Shelby et alii (1994) showed differential production of fumonisins in 15 commercially maize hybrids planted in different locations in USA. Doko et alii (1995) analyzed the behavior of 98 samples of corn genotypes grown in various European and African countries to fumonisin production and found differences among the genotypes in terms of the natural occurrence of fumonisins. On the other hand, the study of fumonisin occurrence in hybrids grown across the U.S. corn belt indicated that hybrids grown outside their range of adaptation had higher fumonisin concentrations (Shelby et alii, 1994), suggesting the important role of temperature stress. Visconti (1996) presented data on the occurrence of FB1 and FB2 in maize genotypes (inbred lines and hybrids) cultivated in several countries located in three continents. He suggested that the environmental conditions in the specific area of cultivation play an important role in the accumulation of fumonisins in maize.

The present work aimed at evaluating the fumonisin contamination in commercial maize hybrids cultivated in Junin and Pergamino, located at the most important area of corn production in Argentina, harvested in 1996 and 1997, respectively. Endosperm characteristics, vegetative cycle length, type of hybrid cross of the corn hybrids and environmental conditions in the specific area of cultivation were studied as possible factors influencing the accumulation of fumonisin in maize grains.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Sampling. Samples of commercial corn hybrids were obtained from the Experimental Agricultural Station INTA Pergamino, Argentina. Two assays were conducted in the area of Junin during the growing season of October 1995 to April 1996 involving: (a) 29 intermediate cycle hybrids, (b) 37 full cycle hybrids. Two other assays were conducted in the area of Pergamino during the growing season of October 1996 to April 1997 involving: (a) 32 intermediate cycle hybrids, (b) 46 full cycle hybrids.

The corn hybrids were arranged in a randomized complete-block design with three replications occupying each an area of 7.35 m² in Junin (95/96 plantings) and an area of 5.95 m² in Pergamino (96/97 plantings). For sampling, all ears in each block were hand-harvested. The kernels were shelled, pooled, and dried. Two samples of 1 kg were taken for fumonisin and moisture content determinations, respectively. The sample destined to fumonisin determination was ground to pass through 1-mm screen in Wiley laboratory mill and thoroughly mixed. The samples were stored at 2°C both before and after grinding.

Fumonisins determination. The AOAC method 995.15 (AOAC Int., 1997, section 49.10.03) for the determination of fumonisins B1 and B2 was employed with minor modifications. The toxins were

extracted with methanol-water (3+1) from 25 g sub-samples. The methanol-water extract was applied to a strong anion-exchange cartridge (500 mg, Supelclean LC-SAX, Supelco) preconditioned with methanol followed by methanol-water. The fumonisins were eluted with acetic acid-methanol (1+99). The eluting solvent was evaporated with the help of nitrogen. Fumonisins were then derivatized with o-phthalaldehyde (OPA). The OPA-fumonisins derivatives were analyzed by HPLC with fluorescence detection (Shimadzu, models LC-10A pumps, EZ chrom Data System, and FR-551 fluorescence detector), with a Lichrocart column C-8, 5 μ m particles, 125 x 4 mm. Oven temperature was 35°C, and excitation and emission wavelengths were 335 nm and 440 nm, respectively. The mobile phase was methanol/disodium hydrogen phosphate 0.05 M (65+35; v/v) adjusted with o-phosphoric acid to pH 3.35, at a flow of 1.8 mL/min. External calibration with fumonisins standards (Sigma) was employed for quantification.

Statistics. Statistical analysis were performed with the help of the Statistical Analysis System (SAS) program (SAS Institute Inc.). The fumonisins content of the corn samples was examined in respect to the factors year (1996 or 1997), vegetative cycle (full season hybrid or intermediate), type of hybrid (single, double, and three way crosses), and endosperm characteristic (dent, flint, and semident) using analysis of variance after choosing an adequate transform according to Taylor's method (Rickwood and Fry, 1993). Kruskal – Wallis non parametric test (Conover, 1980) was employed to verify if a significant difference existed between the average monthly relative humidity, the total monthly rainfall and the average monthly temperature of the two growing seasons (95/96 and 96/97).

RESULTS AND DISCUSSION

Fumonisins levels in maize hybrids -

Recovery tests were conducted on quadruplicate spiked corn samples at four levels: 125, 250, 500, and 1000 ng/g for FB1 and FB2. The recoveries ranged from 62 to 78%, with an average of 68 ± 2 , for FB1, and from 77 to 98%, with an average of 86 ± 5 , for FB2. The relative standard deviations were always less than 12% for FB1 and less than 8% for FB2. The detection limits were 11 ng/g for FB1 and for FB2.

Individual results for the FB1 and FB2 determinations in the maize hybrids (single-crosses, double-crosses and three – way crosses) and the endosperm characteristics are shown on Tables 1 – 4. The overall data have been divided into four groups according to growing season (1995/96 or 1996/97), area of cultivation (Junin or Pergamino) and vegetative cycle length (full season hybrid and intermediate hybrid).

The maize hybrids grown in Junin from October 1995 to April 1996 contained fumonisin B1 (Table 1) at levels ranging from not detected to 838 ng/g (mean 131 ng/g) for intermediate cycle maize hybrids and not detected to 662 ng/g for FB2 (mean = 58 ng/g). The levels of fumonisins ranged from not detected to 470 ng/g for FB1 (mean = 62 ng/g) and from not detected to 138 ng/g for FB2 (mean = 13 ng/g) for full cycle maize hybrids (Table 2). The total fumonisins concentration (FB1 + FB2) varied from not detected to 1014 ng/g for intermediate cycle cycle maize hybrids, with an average value of 188 ng/g, and from not detected to 602 ng/g for full cycle maize hybrids (with an average value of 74 ng/g). One sample contained fumonisins at a level higher than 1000 ng/g whereas 24 samples (36%) were contaminated with levels above 100 ng/g (Tables 1 and 2).

The maize hybrids, grown in Pergamino from October 1996 to April 1997, contained fumonisins B1 and B2 at levels ranging from 66 to 11160 ng/g for FB1 (mean concentration of 3183 ng/g) and from 27 to 3526 ng/g for FB2 (mean concentration of 995 ng/g) for intermediate cycle maize hybrids (Table 3). Fumonisin B1 and B2 ranged from 499 to 10791 ng/g for FB1 (mean concentration of 3846 ng/g) and from 87 to 4597 ng/g for FB2 (mean concentration of 1166 ng/g) for full cycle maize hybrids (Table 4). Total fumonisins concentration (FB1 + FB2) varied from 94 -14886 ng/g (with an average value of 4178 ng/g) for intermediate cycle maize hybrids, and from 586-15388 ng/g (with an average value of 5013 ng/g) for full cycle maize hybrids. More than 90% of the samples contained fumonisin levels higher than 1000 ng/g and 26 samples (33%) were contaminated with levels above 5000 ng/g (Tables 3 and 4). The Mycotoxin Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians issued advisory levels for FB1 in feeds of 5, 10, 50 and 50 mg/kg for horses, pigs, beef cattle and poultry, respectively (Riley et alii, 1993). Under these recommendations, 26 samples (33%) of the maize hybrids samples should be considered hazardous to feed to horses and 7 samples (9%) hazardous to feed horses and pigs.

The fumonisins levels in maize hybrids planted during the 96/97 season were strikingly higher than the levels in the maize hybrids planted during the 95/96 season. This holds true for all hybrids as well as for the hybrids planted during both seasons. This fact shows that hybrids being screened for possible resistance to fumonisins production must be evaluated during more than one season. In general the average levels of fumonisins during the 96/97 season were higher than those detected in genotypes from Cordoba Province, Argentina (Ramirez et alii, 1996) and from Italy or Portugal (Doko et alii, 1995), but lower than those detected among commercial corn hybrids grown in different locations of the United States (Shelby et alii, 1994).

The FB2/FB1 ratio for maize hybrids grown from October 1995 to April 1996 and from October 1996 to April 1997, ranged from 0.12 to 0.76 (mean $\pm$ SD = 0.29 ± 0.11). The atypical values of 2.63, 1.48 and 1.59 found in the hybrids Cargill 260, Sursem Axel and Zeneca 8389 are excluded from this range. These hybrids were grown from October 1995 to April 1996 (Tables 1 and 2). The data are in agreement with previously reported fumonisins contents in commercial corn hybrids from another province in Argentina (Ramirez et alii, 1996) and from other countries (Doko et alii, 1995). The higher levels of FB2 than FB1 could possibly be caused by atypical strains of *F. moniliforme* and/or *F. proliferatum* that are able to produce more FB2 than FB1. Strains like this were detected in previous studies carried out in Argentina (Sydenham et alii, 1993; Chulze et alii, 1996; Ramirez et alii, 1996) as well as in other countries (Nelson, 1994).

Effect of biotic and abiotic factors in fumonisins production -

Forty four corn hybrids were planted during both growing seasons (Tables 1 - 4). The results showed lower levels of fumonisins in the hybrids planted during the first growing season (95/96, Junin) and much higher levels during the second season (96/97, Pergamino). The effect of several factors on the variable being observed (fumonisins content) was studied: year (1996 or 1997), vegetative cycle (full season hybrid or intermediate), type of hybrid (single, double, and three way crosses), and endosperm characteristic (dent, flint, and semident). The factors year and location cannot be differentiated from the stand point of the statistical analysis and the number of observations were unequal. The number of hybrids for the different types of endosperm (dent, semident, and flint) was not balanced and in some cases the double cross hybrids were missing. No correction was made to the fact that no values could be ascribed to the variable observed (fumonisins levels) bellow 11 ng/g. As the data showed great variability, preliminary tests were conducted to choose the transform that allowed the use of a linear model for the analysis of variance (ANOVA). The preliminary tests results lead to rejection of more common transforms such as logarithm and square root. The application of Taylor's method () indicated the exponent $\frac{1}{4}$ allowed the use of a linear model for the data. The transformed data were analyzed according to the equation bellow:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha*\beta)_{ij} + \phi_k(\alpha*\beta)_{ij} + \varepsilon_{1(ijk)}$$

Where, y_{ijk} = variable transformed by the exponent $\frac{1}{4}$, α_i = year effect, β_j = hybrid cycle effect, $(\alpha*\beta)_{ij}$ = effect of the interaction year and cycle, $\phi_k(\alpha*\beta)_{ij}$ = effect of the type of endosperm in the interaction year/hybrid cycle, and $\varepsilon_{(ijk)}$ = random component that includes the distinct origins of the hybrids.

The results of the F- tests indicated a significant difference for the factor year. A distinct picture did not exist for the other factors. The analysis of the residues to check the validity of the tests conducted indicated that the errors did not escape from a symmetrical distribution and that the variances were homogeneous.

The data relating the average monthly relative humidity, the average monthly rainfall, and the average monthly temperature (Tables 5 and 6) for the two growing seasons were examined by Kruskal – Walis non parametric test (Conover, 1980) in order to investigate possible differences in the weather conditions during the two growing seasons. Only the average relative humidity resulted to be significantly different from one season to the other. This leads to the conclusion that the higher relative humidity was the major factor responsible for the much higher fumonisins levels in the maize hybrids during the 1996/97 season when compared to the 1995/97 season.

Little is known about the production of fumonisins in maize in field conditions (Miller, 1994). Ramirez et alii (1996) showed that after physiological maturity *F. moniliforme* and *F. proliferatum* are the most frequently isolated fungal species in maize in Argentina and that the contamination with fumonisins is greater than before physiological maturity. It is believed that temperature determines the predominant species of *Fusarium* in corn (Miller, 1994). Evidence has pointed out toward airborne and insect – borne inoculum as the main *F. moniliforme* infection route for corn kernels in spite of this species to be known for causing asymptomatic infections in corn stalks, stems, and roots (Snijders, 1994). In the present study temperature monthly averages and average rainfall were not significantly different from one growing season to another.

Another important factor to be considered in the contamination levels of the maize harvested in Junin and in Pergamino is the high incidence of lodging verified in Pergamino during the 96/97 growing season (Presello et alii, 1997). No lodging was observed in the hybrids planted in Junin during the 95/96 growing season (Presello et alii, 1996). Lodging is closely connected to susceptibility to stalk rot and it is observed to increase with delay in harvesting (Snijders, 1994). Adverse weather conditions can also cause lodging (Presello et alii, 1997). The experimental maize plots in Pergamino had a delayed harvest due to bad weather and had an average of 30 % lodging for the intermediate cycle hybrids and 31 % for the full cycle hybrids (Presello et alii, 1997).

The present study shows a marked difference for the same genotypes during two consecutive growing seasons in terms of fumonisins contamination. It also shows that none of these genotypes was resistant to undetermined toxigenic strains of fumonisins producing *Fusarium* species naturally occurring in the experimental plots when conditions in the second season were possibly more appropriate for infection and toxin production.

Even though maize is one of the major crops grown in Argentina, human dietary consumption within the country is relatively low compared to that of wheat-based products. Nevertheless, the

levels of fumonisins found in corn are a matter of concern because of the health implication of low levels of fumonisins in human foods is still unknown.

ACKNOWLEDGEMENTS

A fellowship to the author from CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil - is gratefully acknowledged. We also thank the Xenobióticos Laboratory S.A. Argentina for the help with laboratory facilities and sponsoring reagents and standards.

LITERATURE CITED

AOAC INTERNATIONAL, 1997, Official Methods of Analysis of the AOAC International, edited by P. Cunniff (Gaithersburg: AOAC International) Chapter 49, pp. 1-51.

BUCCI, T.; HANSEN, D.K.; & LABORDE, J.B. Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin Fumonisin B1. *Natural toxins* 1996, 4, 51 – 51.

BACON, C.W., & NELSON, P.E.. Fumonsin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *Journal of Food Protection*, 1994, 57, 514 – 521.

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

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*, 1996, 44, 2797-2801.

CONOVER, W.J. Practical nonparametric statistics. John Wiley & Sons, 1980, Chapter 5, pp. 229-237.

DOKO, M.B., RAPIOR, S., VISCONTI, A. & SCHJOTH, J.E. Incidence and levels of fumonisin

- GELDERBLOM, W.C.A., KRIIEK, N.P.J., MARASAS, W.F.O., AND THIEL, P.G. 1991. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats. *Carcinogenesis*, **12**, 1247-1251.
- GONZALEZ, H.H.L., RESNIK, S.L., BOCA, R.T., MARASAS, W.F.O., Mycoflora of Argentinian corn harvested in the main production area in 1990. *Mycopathologia*, 1995, **130**, 29-36.
- HARRISON, L.R., COLVIN, B., GREENE, J.T., NEWMAN, L.E. AND COLE Jr, J.R.. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *Journal of Veterinary and Diagnostic Investigations*, 1990, **2**, 217-221.
- KING, S.B. & SCOTT, G.E. Genotypic differences in maize to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, 1981, **71**, 1245-1247.
- MILLER, J.D. Epidemiology of *Fusarium* ear diseases of cereals. . In: MILLER, J.D.; TRENHOLM, H.L. (eds) *Mycotoxins in grain: Compounds other than aflatoxin*. Eagan Press, St. Paul, 1994, p. 19 – 36.
- MUÑOZ, R. Mercados de maiz. *Revista de Tecnología Agropecuaria – INTA Pergamino*. 1996, Segundo cuatrimestre, Mayo/Ago, 29-31.
- MUSSER, S.M. & PLATTNER, R.D. Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium nygami*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1997, **45**, 1169 – 1173.
- NELSON, P.E., DESJARDINS, ^aE., & PLATTNER, R.D. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: Biology, chemistry, and significance. *Annual Review of Phytopathology*, 1993, **31**, 233 – 252.
- NELSON, P.E., JUBA, J.H., ROSS, P.F. & RICE, L.G. Fumonisin production by *Fusarium* species on solid substrates. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, 1994, **77**, 522-524.
- PIZARRO, V., J.B. Maiz: evolucion de la produccion nacional y por regiones. *Revista de Tecnología Agropecuaria. INTA-Pergamino*. 1996, Segundo cuatrimestre, Mayo/Ago, 22-28.

- POEHLMAN, J.M. & SLEPER, D.A. *Breeding field crops*. Iowa State University Press, Ames, 4th ed., 485 pp. 1995.
- PRESELLO, D., CELIZ, A., FERNANDEZ, A., DAMILANO, A. & COLAZO, J. Comportamiento de cultivares de maiz en el area de la EEA Pergamino Campaña 1995/96. *Revista de Tecnología Agropecuaria – INTA Pergamino*, 1996, Segundo cuatrimestre, Mayo/Ago, 1-4.
- PRESELLO, D., ALVAREZ, M.P., COLAZO, J.C., DAMILANO, A., EYHERABIDE, G., FERNANDEZ, A. & HOURQUESCOS, M.J. Comportamiento de cultivares de maiz en el norte de la provincia de Buenos Aires y area endemica del mal de Rio Cuarto. Ciclo 1996/97. *Revista de Tecnología Agropecuaria – INTA Pergamino*, 1997, Segundo cuatrimestre, Mayo/Ago, 1-6.
- 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 commercail hybrids growth in Argentina. *Mycopathologia*, 1996, **135**, 29-34.
- RICKWOOD, D. AND FRY, J.C. *Biological Data Analysis – A practica Approach*, Oxford University Press, London, 1993.
- RILEY, R.J., NORRED, W.P., BACON, C.W. Fungal toxins in foods: recent concerns. *Annual Review of Nutrition*, 1993, **13**, 167-189.
- ROSS, P.F., NELSON, P.E., RICHARD, J.L., OSWEILER, G.D., RICE, L.G., PLATTNER, R.D., AND WILSON, T.M. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. *Applied Environmental Microbiology*, 1990, **56**, 3225-3226.
- SCOTT, P.M. Fumonisin - mini-review. *International Journal of Food Microbiology*, 1993, **18**, 257-270.
- SHELBY, R.A., WHITE, D.G. & BAUSKE, E.M. Differential fumonisin production in maize hybrids. *Plant Disease*, 1994, **78**, 582-584.
- SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., STOCKENSTRÖM, S. and SYDENHAM, E.W. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, 1996, **79**, 671-687.

SNIJDEERS, C.H.A . Breeding for resistance to *Fusarium* in wheat and maize. In: MILLER, J.D.; TRENHOLM, H.L. (eds) *Mycotoxins in grain: Compounds other than aflatoxin*. Eagan Press, St. Paul, 1994, p. 37 – 58.

SYDENHAM, E.W., THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O., SHEPHARD, G.S., VAN SCHALKWYK, D.J. AND 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*, 1990, **38**, 1900-1903.

SYDENHAM, E.W., SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., MARASAS, W.F.O., RHEEDER, J.P., SANHUEZA, C.E.P., GONZALEZ, H.H.L. & RESNIK, S.L. Fumonisin in Argentinian field-trial corn. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International*, 1993, **41**, 891-895.

VISCONTI, A. Fumonisin in maize genotypes grown in various geographic areas. *Advanced Experiments on Medicine and Biology*, 1996, **392**, 193-204.

WANG, E., NORRED, W.P., BACON, C.W., RILEY, R.T. AND MERRILL Jr, A.H. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, **266**, 14486-14490.

Table 1. Intermediate cycle maize hybrids grown in Junin, Buenos Aires Province, Argentina, from October 1995 to April 1996: Characteristics and levels of fumonisins FB1 and FB2.

Maize hybrids	Endosperm characteristics	Fumonisin levels (ng/g) ^a		
		FB ₁	FB ₂	FB ₁ +FB ₂
Single crosses				
Cargill 260	dent	252	662	914
Cargill 7997	dent	24	nd	24
Dekalb 638	semident	243	63	306
Dekalb 664	dent	nd	nd	nd
Novartis Capitan	dent	nd	nd	nd
Morgan 3	dent	604	198	802
Nidera AX 699	dent	157	47	204
Nidera AX 777	dent	282	96	378
Nidera AX 824	dent	150	44	194
Oldenburg Lorien	-	113	79	192
Pioneer 3162	semident	19	nd	19
SPS 2601	dent	nd	nd	nd
Sursem Axel	dent	40	59	99
Tresur Dorado	dent	42	15	57
Tresur Ventur	-	54	nd	54
Zeneca 8532	dent	nd	nd	nd
Zeneca 8543	dent	134	34	168
Three way crosses				
Cargill M31	dent	147	42	189
Novartis Branqui	semident	41	18	59
Dekalb 651	dent	110	22	132
Fenix INTA	semident	nd	nd	nd
Nidera A 830	semident	165	22	187
Pioneer 3468	dent	838	176	1014
Prozea 25	dent	136	24	160
SPS 3401	dent	nd	nd	nd
SPS 3500	semident	nd	nd	nd
SPS 3505	flint	nd	nd	nd
Sursem Aramis	semident	nd	nd	nd
Tresur Noble	dent	246	67	313
Mean levels ± SD		131± 189	58 ± 127	188 ± 273

Entries in negrito – hybrids planted during the seasons of 1995/96 and 1996/97.

^a nd = not detected, < 11 ng/g

(-) unknown endosperm characteristic

Table 2. Full cycle maize hybrids grown in Junin, Buenos Aires Province, Argentina, from October 1995 to April 1996: Characteristics and fumonisins FB1 and FB2 levels.

Maize hybrids	Endosperm characteristics	Fumonisin levels (ng/g) ^a		
		FB ₁	FB ₂	FB ₁ +FB ₂
Single crosses				
A Cross Elisa	-	nd	nd	nd
Cargill 280	semident	62	nd	62
Novartis Aymara	flint	106	22	128
Novartis Tilcara	semident	nd	nd	nd
Dekalb 752	semident	nd	nd	nd
Dekalb exp 675	-	nd	nd	nd
Morgan 4	semident	104	44	148
Nidera AX 845	dent	nd	nd	Nd
Nidera AX 972	semident	131	21	152
Oldenburg Elrond	-	Nd	nd	nd
Pioneer 3456	dent	nd	nd	nd
SPS 2700	flint	58	nd	58
Sursem Midas	semident	53	nd	53
Zeneca 8389	semident	19	30	49
Three way crosses				
ACA 923	flint	nd	nd	nd
Cargill Tri 43	-	90	26	116
Cargill Tri 92	semident	89	25	114
Novartis Ambaio	semident	30	nd	30
Novartis Chapelco	semident	53	19	72
Novartis Tronador	semident	36	nd	36
Morgan 306	flint	27	nd	27
Morgan 307	flint	190	44	234
Morgan 317	flint	nd	nd	nd
Morgan 319	flint	116	27	143
Morgan 370	semident	151	18	169
Nidera A 950	flint	70	nd	70
Nidera A 973	semident	nd	nd	nd
Pioneer 3478	dent	61	17	78
Prozea 20	semident	nd	nd	nd
Sursem Atlas	semident	16	nd	16
Sursem Rodas	semident	nd	nd	nd
Double crosses				
Cargill Record 160	semident	135	18	153
Dekalb 761	flint	49	12	61
Dekalb 763	semident	470	138	602
Morgan 401	flint	104	22	126
SPS 4720	flint	33	nd	33
Zeneca 8340	flint	28	nd	28
Mean levels ± SD		62± 86	13 ± 25	74 ± 109

Entries in negrito – hybrids planted during the seasons of 1995/96 and 1996/97.

^a nd = not detected, < 11 ng/g

(-) unknown endosperm characteristic

Table 3. Intermediate cycle maize hybrids grown in Pergamino, Buenos Aires Province, Argentina, from October 1996 to April 1997: Characteristics and fumonisins FB1 and FB2 levels.

Maize hybrid	Endosperm characteristics	Fumonisin levels (ng/g) ^a		
		FB ₁	FB ₂	FB ₁ +FB ₂
Single - crosses				
A Cross N 7590	-	2225	364	2589
Agromania 2000	-	3040	859	3899
Cargill 260	dent	3685	981	4666
Cargill 271	dent	1061	814	1875
Cargill 7301	-	1528	363	1891
Cargill 7997	dent	1332	313	1645
Dekalb 639	semident	8022	2057	10079
Dekalb 664	dent	840	214	1054
Dekalb 669	dent	79	27	106
Dekalb 689	semident	1298	338	1636
Morgan 3	dent	438	123	561
Nidera AX 699	dent	3645	2667	6312
Novartis Capitan	dent	3738	1244	4982
Novartis Copahue	dent	4194	1184	5378
Pioneer 3162	semident	2468	535	3003
Pioneer 3362	semident	3636	1123	4759
SPS 2601	dent	66	28	94
SPS 2700	flint	1355	341	1696
Sursem Axel	dent	9246	2847	12093
Sursem Goran	dent	340	86	426
Tresur Dorado	dent	4243	1292	5535
Zeneca 8403	dent	6624	2727	9351
Zeneca 8532	dent	802	136	938
Zeneca 8543	dent	11160	3526	14686
Three way crosses				
Cargill Mad 31	dent	9926	3520	13446
Dekalb 651	dent	1508	363	1871
Fenix INTA	semident	843	219	1062
Nidera A 830	semident	1658	209	1867
Novartis Branqui	semident	4618	1223	5841
Prozea 25	dent	1680	400	2080
Sursem Aramis	semident	2232	506	2738
Tresur Noble	dent	4333	1196	5529
Mean levels ± SD		3183± 2932	995 ± 1029	4178 ± 3916

Entries in negrito – hybrids planted during the seasons of 1995/96 and 1996/97.

^a nd = not detected, < 11 ng/g

(-) unknown endosperm characteristic

Table 4. Full cycle maize hybrids grown in Pergamino, Buenos Aires Province, Argentina, from October 1996 to April 1997: Characteristics and fumonisins FB1 and FB2 levels.

Maize hybrids	Endosperm characteristics	Fumonisin levels (ng/g) ^a		
		FB ₁	FB ₂	FB ₁ +FB ₂
Single crosses				
A Cross Elisa	-	1698	473	2171
A Cross N 8020	-	7482	1244	8726
Agromania 2050	-	6088	1857	7945
Cargill 280	semident	3846	933	4779
Cargill 285	semident	803	242	1045
Dekalb 752	semident	931	214	1145
Dekalb IP 800	flint	4471	983	5454
Morgan 4	semident	2203	676	2879
Morgan 5	dent	3747	859	4606
Nidera AX 845	dent	499	87	586
Nidera AX 972	semident	3290	854	4144
Novartis Aymara	flint	9731	3050	12781
Novartis Tilcara	semident	4483	953	5436
Pioneer 3456	flint	6947	2507	9454
Pioneer 3457	dent	981	330	1311
Sursem Midas	semident	5274	1604	6878
VDH Coloso	-	3288	408	3696
Zeneca 8321	-	3391	1167	4558
Zeneca 8389	semident	2535	625	3160
Zeneca 8434	-	3240	804	4044
Three way crosses				
ACA 923	flint	10791	4597	15388
ACA 925	semident	2673	568	3241
ACA 926	flint	2862	890	3752
ACA 928	flint	9311	4407	13718
Agromania 3000	-	1385	179	1564
Cargill Tri 92	semident	6986	2022	9008
Novartis Tronador	semident	2370	722	3092
Dekalb 754	semident	6713	1662	8375
Morgan 319	flint	2559	545	3104
Morgan 370	semident	2527	674	3201
Nidera A 950	flint	1979	285	2264
Nidera A 973	semident	1915	699	2614
Novartis Ambaio	semident	5441	1398	6839
Novartis Chapelco	semident	3713	1009	4722
Prozea 20	semident	3932	2041	5973
Sursem Atlas	semident	5383	1924	7307
Sursem Rodas	semident	4732	2451	7183
Double crosses				
Dekalb 762	-	2732	818	3550
Dekalb 763	semident	3544	1318	4862
FR 096	-	2049	826	2875
Morgan 401	flint	866	158	1024
Morgan 507	flint	2383	801	3184
Prozea 40	semident	3966	928	4894
Relmo 4r75	-	3642	870	4512
SPS 4720	flint	3510	772	4282
Zeneca 8340	flint	4039	1215	5254

Mean levels ± SD 3846±2365 1166 ± 977 5013± 3275

Entries in negrito – hybrids planted during the seasons of 1995/96 and 1996/97.

^a nd = not detected, < 11 ng/g

(-) unknown endosperm characteristic

Table 5. Temperature, rainfall and relative humidity in the Junin Experimental Station during the corn growing season of 1995-1996

Environmental conditions *	Month / Year						
	Oct. '95	Nov. '95	Dec. '95	Jan. '96	Feb. '96	Mar. '96	Apr. '96
Minimum temperature ^a	9.6	13.6	15.9	16.0	14.8	14.2	11.5
Mean temperature ^b	15.5	20.1	23.4	20.4	21.1	18.2	16.2
Maximum temperature ^c	21.9	26.7	30.9	30.0	28.3	28.1	21.8
Rainfall ^d	110.9	56.4	68.9	66.8	103.9	28.0	169.3
Relative Humidity ^e	56	55	53	57	56	61	66

* Data obtained from the meteorological station located in the Junin Experimental Station.

^a Monthly minimum temperature (°C)

^b Mean monthly temperature (°C)

^c Monthly maximum temperature (°C)

^d Total monthly rainfall (mm)

^e Mean monthly relative humidity (%)

Table 6. Temperature, rainfall, and relative humidity in the Pergamino experimental Station during the corn growing season of 1996-1997

Environmental conditions *	Month / Year						
	Oct. '96	Nov. '96	Dec. '96	Jan. '97	Feb. '97	Mar. '97	Apr. '97
Minimum temperature ^a	11.0	12.8	16.7	18.4	14.3	14.3	10.5
Mean temperature ^b	17.5	20.6	23.0	24.9	21.1	21.6	18.1
Maximum temperature ^c	24.0	28.4	29.3	31.3	27.7	28.8	25.6
Rainfall ^d	48.4	67.1	96.0	164.0	84.1	46.2	83.9
Relative Humidity ^e	70	66	70	73	73	69	67

* Data obtained from the meteorological station located in the Pergamino Experimental Station.

^a Monthly minimum temperature (°C)

^b Mean monthly temperature (°C)

^c Monthly maximum temperature (°C)

^d Total monthly rainfall (mm)

^e Mean monthly relative humidity (%)

5. ANEXOS

5.1. Material e métodos

5.1.1. Reagentes, solventes e solução

- a) metanol HPLC marca Baker
- b) acetonitrila, marca Merk
- c) ácido fosfórico, marca Merk
- d) água para HPLC, marca Sintogan
- e) 2-mercaptoetanol, marca Sigma Lote 45H0508
- f) ácido acético glacial p.a , marca Merk
- g) hidrogenofosfato de disódio, marca Merk
- h) hidróxido de sódio, marca Merk
- i) tetraborato de sódio, marca Merk
- j) o-ftaldialdeído (OPA), marca Sigma Lote 45H7750 99% de pureza
- k) fumonisina B1 (FB1), marca Sigma lote 44H4036 98% de pureza
- l) fumonisina B2 (FB2), marca Sigma lote 14H0341
- m) solução de acetonitrila:água (1+1;v/v)
- n) solução de ácido acético:metanol (1+99;v/v)
- o) solução de metanol:água (1+1;v/v)
- p) solução de hidróxido de sódio 1M
- q) solução de tetraborato de sódio 0,1M. Dissolver 3,8g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ em 100ml de H_2O
- r) solução de o-ftaldialdeído (OPA). Dissolver 40mg de OPA em 1 ml de metanol, diluir em 5ml de solução de tetraborato de disódio 0,1M, adicionar 50ul de 2-mercaptoetanol e misturar. Estocar a temperatura ambiente protegido da luz não mais que por uma semana.
- s) solução de hidrogeno fosfato de disódio 0,05M. dissolver 7,98 g Na_2HPO_4 em 1 litro H_2O .
- s) Fase móvel para HPLC: metanol:hidrogenofosfato de disódio 0,05M (65+35;v/v) com pH ajustado a 3,35 com ácido fosfórico. Fluxo: 1,8ml/min.
- t) solução padrão de fumonisina B1 100ug/ml. Dissolver 10mg de FB1 em 100ml acetonitrila:água (1+1).
- u) solução padrão I de fumonisina B2 1000ug/ml.Dissolver 10 mg de FB2 em 10ml acetonitrila:água (1+1).
- v) solução padrão II de fumonisina B2 100ug/ml. diluir 1ml da solução padrão I em 10ml de acetonitrila:água (1+1).

As soluções padrões de fumonisinas foram estocadas em freezer a -18°C.

5.1.2. Equipamentos

a) cromatógrafo líquido Shimadzu, Japão

<u>Componente</u>	<u>Modelo</u>
Bomba A	LC-10AS
Bomba B	LC-10AS
Forno para colunas	CTO-10AS
Módulo controlador	SCL-10A
Detector fluorométrico	RF-551
Injector automático	SIL-10A
Sistema de integração e registro de dados	EZChrom

b) coluna - coluna de aço inoxidável de fase reversa C8, 5µm LiChroCART no cat. 50822, dimensões: 125mm de comprimento e 4,0mm de diâmetro interno.

c) detector de fluorescência

comprimento de onda de excitação: 335 nm

comprimento de onda de emissão: 440 nm

d) colunas de extração em fase sólida (SPE)

SAX SUPELCO 5-7017 capacidade de 3 ml contendo 500mg de sílica ligada a trocador aniônico

e) agitador tipo Vortex, Thermolyne

f) equipamento para realizar a extração em fase sólida, Manifold

g) evaporador de solventes, operando a 60°C com sistema de distribuição de ar

h) agitador horizontal, Bioblock Scientific

i) banho de água termostaticado, Ionomex

j) balança de precisão, Acculab

k) balança analítica, Denver

- l) potenciômetro,
- m) seringas de 50ml para usar como reservatório para filtrar
- n) pipetas automáticas variáveis (200-1000ul), Sealpette
- o) balão volumétrico 10ml
- p) dispensador (0-50ml), Socorex
- q) tubos de vidro de 10ml
- r) Erlenmeyer de vidro com tampa plástica de 125ml
- s) Moinho de facas tipo Willey Modelo ED-5, marca Thomas equipado com malha de 1 mm

5.2. Detalhamento da coleta de amostras

Para avaliação da incidência de fumonisinas em milho argentino, neste trabalho, foram utilizadas amostras de grãos de milho (*Zea mays*) separadas em 2 grupos correspondentes a épocas (safra 1995/96 e safra 1996/97) e localidades de cultivo (Junin e Pergamino, Argentina) diferentes.

O primeiro grupo foi cultivado na localidade de Junin (Estância Don Alejandro), província de Buenos Aires, onde se realizaram dois ensaios em desenho de blocos, completamente aleatorizados de três repetições com parcelas de 7,35 m². Um deles incluía 29 híbridos de ciclo semiprecoce e o outro 37 híbridos de ciclo normal. O solo nesta localidade é arenoso e de fácil penetração radicular e durante o cultivo houve na região períodos de seca. Não houve irrigação. Nos dois anos anteriores girasol havia sido cultivado no local. A semeadura foi realizada em 18/10/95, sob forma manual, dois grãos por golpe a uma densidade de 60.000 plantas por hectare. Houve controle de ervas daninhas com herbicidas de pré-emergência (utilizados imediatamente após o plantio e antes da emergência das plantas daninhas e da cultura). A colheita foi de forma manual. Após a debulha, os grãos entraram em equilíbrio com a umidade em galpão.

O segundo grupo foi cultivado na estação experimental da localidade de Pergamino, província de Buenos Aires, aonde se realizaram dois ensaios em desenho de blocos, completamente

aleatorizados de três repetições com parcelas de 5,95 m². Um deles incluiu 32 híbridos de ciclo semiprecoce e o outro 46 híbridos de ciclo normal. O solo nesta região é do tipo argiloso e não houve irrigação. O cultivo nos quatro anos anteriores havia sido soja. A semeadura foi realizada no dia 07/10/96, sob forma manual, dois grãos por cova a uma densidade de 67.000 plantas por hectare. O controle de ervas daninhas foi realizado através de duas aplicações de Atrazina 90% e Metaclor 96%, durante a semeadura e capina). A colheita foi feita de forma manual. Após a debulha foi permitido aos grãos atingir a umidade do galpão de armazenagem.

A cultura do milho apresenta ciclo variável entre 110 e 180 dias, em função da caracterização dos cultivares (precoce, intermediário ou semiprecoce, normal e tardio), período este compreendido entre o plantio e a colheita.

Adicionalmente, no período de outubro de 1996 a janeiro de 1997 foram coletadas 19 amostras de produtos a base de milho (farinha de milho usada para fazer polenta e milho usado para fazer canjica) oferecidas ao consumo humano na capital argentina. Quinze amostras de diferentes marcas registradas, foram adquiridas em supermercados e 4 amostras de farinha de milho comercializadas a granel (sem marca registrada) foram obtidas em pequenos mercados.

5.3. Preparo e armazenamento das amostras para análise

As amostras de milho em grão, fornecidas pela estação experimental de Pergamino, do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, Argentina, constituíram-se de aproximadamente um quilograma. A totalidade de cada amostra foi moída em moinho de facas, equipado com malha de 1 mm. As amostras antes e depois da moagem foram armazenadas em freezer a -18°C.

As amostras de produtos a base de milho, destinado ao consumo humano, coletadas em mercados da capital argentina, foram analisadas sem proceder à nova moagem, com exceção do milho para canjica, que foi submetido ao processo de moagem mencionado acima.

5.4. Extração e purificação de amostras

Vinte e cinco gramas da amostra de milho na forma de farinha foram extraídas com 50 ml de metanol:água (3+1), em agitador horizontal por 45 minutos. Em seguida a mistura foi submetida a agitador do tipo Vortex por 2 minutos e filtrada através de algodão montado em seringa de 50 ml.. O pH do filtrado foi ajustado a 5,8 - 6,5 quando necessário, usando NaOH 1M. As colunas de extração

em fase sólida (500 mg, Superclean LC-SAX, Supelco) acopladas ao equipamento específico foram pré-condicionadas por lavagem sucessiva com 5 ml de metanol, seguida por 5 ml de metanol+água (50+50). Foram aplicados na coluna 10 ml do filtrado, mantendo um fluxo de ≤ 2 ml/min. As colunas foram então lavadas com 8ml metanol+água (3:1), seguidos de 3 ml de metanol. Sem deixar a coluna secar, as fumonisinas foram eluídas com 8 ml de metanol:ácido acético a 1%, a um fluxo de ≤ 1 ml/min. Os extratos foram evaporados sob jato de ar em banho de água a 60°C. Os frascos de evaporação foram enxaguados com metanol lavando os seus lados de forma a concentrar o resíduo em sua base. O metanol adicionado foi evaporado à secura de forma a assegurar-se que o ácido acético tivesse sido totalmente evaporado. Os resíduos das amostras secas, se não eram analisados no mesmo dia, eram armazenados a 4°C até o momento da análise, não ultrapassando uma semana de armazenamento.

5.5. Derivação e análise por cromatografia líquida

a) Preparação dos derivados dos padrões

Uma alíquota com 25 μ l de cada solução padrão de FB1 e FB2, ambos na concentração de 100 μ g/ml, foram evaporados à secura e a seguir dissolvidos em 100 μ l de Borax 0,1M. Desta solução de FB1 e FB2 em Borax, 25 μ l foram transferidos ao frasco do injetor automático. Foram adicionados automaticamente a esse frasco 100 μ l da mistura de derivação (reagente de OPA), misturados, e 20 μ l foram injetados no cromatógrafo líquido dentro de um minuto após a adição do reativo OPA.

b) Resposta do detector e registro

A escala utilizada para registro foi de 0 a 0,20 Volts. A curva de linearidade com padrões injetados nas quantidades de 25, 50, 100 e 200 ng apresentou como coeficiente de correlação ($R^2=0,9984$) e 100 ng de FB1 derivatizado produzia um pico com altura correspondente a 60%.

c) Derivação dos extratos de milho

O resíduo do extrato purificado foi redissolvido em 100 μ l de Borax 0,1M. Desta solução 25 μ l foram transferidos ao frasco do injetor automático. Foram adicionados automaticamente a esse frasco 100 μ l da mistura de derivação, misturados e 20 μ l são injetados no cromatógrafo líquido dentro de um minuto após a adição do reativo OPA.

A identificação dos picos foi por comparação dos tempos de retenção nos extratos com aqueles observados nos padrões de fumonisinas.

5.6. Estudo de performance do método

Uma amostra de milho não contaminado foi fortificado artificialmente com alíquotas de padrão de FB1 e FB2 em 4 níveis diferentes (125, 250, 500 e 1000 ng/g). Foi analisada igualmente em quadruplicata esta mesma amostra não fortificada.

A análise estatística dos resultados permitiram determinar a média de recuperação, o desvio padrão e o coeficiente de variação em cada nível de fortificação, assim como para todos os níveis de fortificação. Também permitiu a determinação do coeficiente de correlação da curva de recuperações, o limite mínimo detectável, o limite mínimo quantificável e a repetibilidade do método.

O limite mínimo detectável foi estabelecido como a concentração nominal zero da hipérbole superior de confiança da regressão, obtida ao nível de significação $\alpha = 0,05$, extrapolado ao eixo dos x.

5.7. Controle de qualidade das análises

Em cada partida de amostras foram incluídas uma amostra testemunha (branco) e duas amostras fortificadas com 500 ng/g de FB1 e FB2. Os resultados foram corrigidos pela média das recuperações.