

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA

Departamento de Ciência de Alimentos – DCA

FUMONISINAS EM CULTIVARES DE MILHO NO ESTADO DE SÃO PAULO: INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS DO CULTIVAR E DAS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS.

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Simone Magda Camargos, aprovada pela Comissão Julgadora em 24 de fevereiro de 2000.

Simone Magda Camargos

Médica Veterinária

Mestre em Ciência de Alimentos

Campinas, 24 de fevereiro de 2000.



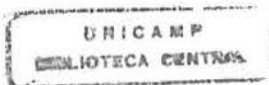
Profa. Dra. Lucia M. Valente Soares
Presidente da Banca

Profa. Dra. Lucia M. Valente Soares

Orientadora

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Campinas, 2000



UNIDADE FEA
 N.º CHAMADA: T/UNICAMP
C14f
 V. Ex.
 TCMG 90/ 40820
 PAGO. 278100
 C ☐ D ☒
 PREÇO 899,00
 DATA 30/03/00
 N.º CPD 7
FEA/T/2000/1480

CM-00138972-4

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

C14f Camargos, Simone Magda
 Fumonisinias em cultivares de milho no estado de São Paulo:
 influência das características do cultivar e das condições
 climáticas / Simone Magda Camargos. – Campinas, SP: [s.n.],
 2000.

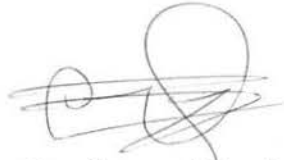
Orientador: Lucia Maria Valente Soares
 Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Engenharia de Alimentos.

I. Micotoxinas. 2. Fusarium. 3. Milho. 4. Cromatografia
 líquida. I. Soares, Lucia Maria Valente. II. Universidade
 Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
 III. Título.

BANCA EXAMINADORA

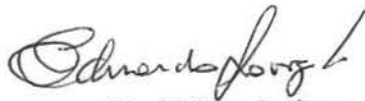


Profª Dra. Lucia Maria Valente Soares (Orientadora)



Dr. Benedito Correa (Membro)

Profª. Dra. Célia Maria de Sylos (Membro)



Dr. Eduardo Sawazaki (Membro)

Profª. Dra. Heloísa Máscia Cecchi (Membro)



Dr. Homero Fonseca (Membro)



Dra. Myrna Sabino (Membro)

Campinas, SP,

de

de 2000

DEDICATÓRIA

Ao meu filho Marcelo e ao meu marido
Christoph pelo amor, carinho e compreensão
nos momentos em que estive ausente.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lucia Maria Valente Soares pela dedicação e brilhante orientação.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da Bolsa de Estudos.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro.

Aos Engenheiros Agrônomos Jairo Lopes de Castro, Guido De Sordi, Denizart Bolonhezi e Nelson Bortoletto pela colheita e envio dos grãos de milho das Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga.

Ao Laboratório de Cereais, Raízes e Tubérculos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP pela concessão do uso do moinho.

Ao Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP pela concessão do uso da centrífuga.

Ao Engenheiro Agrônomo e Pesquisador Científico do Instituto Agronômico de Campinas, Dr. Eduardo Sawazaki pela análise estatística dos dados.

Aos membros da Banca Examinadora.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A Deus pela força nos momentos de maior dificuldade.

ÍNDICE

RESUMO	I
SUMMARY.....	3
INTRODUÇÃO.....	5
REVISÃO DA LITERATURA.....	7
1. MILHO.....	7
2. MICROBIÓTA FÚNGICA DO MILHO.....	8
3. FUMONISINAS.....	13
3.1. Propriedades físicas, químicas e efeitos biológicos.....	13
3.2 Incidência de fumonisinas e microrganismos produtores.....	16
3.3 Avaliação de risco das fumonisinas para humanos.....	21
3.4. Estabilidade das fumonisinas e métodos de descontaminação.....	23
4. FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE FUMONISINAS NO CAMPO.....	27
5. MÉTODOS DE ANÁLISE.....	37
5.1. Extração e limpeza.....	38
5.2. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	39
5.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	40
5.4. Cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG/EM).....	43
5.5. Bioensaios e imunoensaios.....	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
 AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS B₁ E B₂ EM MILHO.....	 64
RESUMO.....	64
ABSTRACT.....	64
INTRODUÇÃO.....	65

MATERIAL E MÉTODOS.....	67
1. Amostras.....	67
2. Padrões de fumonisinas B ₁ e B ₂	67
3. Solventes e reagentes.....	68
4. Fase móvel.....	68
5. Reagente de derivação.....	68
6. Equipamentos.....	68
7. Otimização da separação cromatográfica das fumonisinas B ₁ e B ₂	69
8. Otimização da derivação da fumonisina B ₁ com o-ftaldialdeído.....	69
9. Avaliação de sistemas de extração e limpeza.....	69
10. Avaliação de colunas de extração em fase sólida.....	70
11. Recuperação, repetibilidade e limites de detecção.....	70
12. Descontaminação do material.....	70
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
1. Otimização das condições de eluição no cromatógrafo a líquido.....	71
2. Formação do derivado FB ₁ -OPA.....	74
3. Avaliação de sistemas de extração e limpeza.....	76
4. Avaliação de colunas de extração em fase sólida.....	78
5. Recuperação, repetibilidade e limites de detecção.....	80
CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

FUMONISINAS EM CULTIVARES DE MILHO NO ESTADO DE SÃO PAULO: INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS DO CULTIVAR E DAS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS DA SAFRA DE 94/95	88
RESUMO.....	88
INTRODUÇÃO.....	89
MATERIAL E MÉTODOS.....	91
1. Amostras.....	91
2. Avaliação das características agronômicas.....	92
3. Padrões de fumonisinas B ₁ e B ₂	93

4. Análise das fumonisinas.....	93
5. Controle de qualidade analítico.....	94
6. Descontaminação do material.....	95
7. Análise estatística.....	95
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95
1. Controle de qualidade analítico.....	95
2. Incidência de fumonisinas.....	96
3. Influência das características agronômicas na produção de fumonisinas.....	100
4. Influência dos fatores climáticos na produção de fumonisinas.....	104
CONCLUSÕES.....	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

FUMONISINAS EM CULTIVARES DE MILHO NO ESTADO DE SÃO PAULO: INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS DO CULTIVAR E DAS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS DA SAFRA DE 97/98	115
RESUMO.....	115
INTRODUÇÃO.....	115
MATERIAL E MÉTODOS.....	118
1. Amostras.....	118
2. Avaliação das características agronômicas.....	120
3. Padrões de fumonisinas B ₁ e B ₂	121
4. Análise das fumonisinas.....	121
5. Controle de qualidade analítico.....	122
6. Descontaminação do material.....	123
7. Análise estatística.....	123
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	123
1. Controle de qualidade analítico.....	123
2. Incidência de fumonisinas.....	124
3. Influência das características agronômicas na produção de fumonisinas.....	129
4. Influência dos fatores climáticos na produção de fumonisinas.....	134

CONCLUSÕES.....	139
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	140

FUMONISINAS EM CULTIVARES DE MILHO DE DIFERENTES REGIÕES E SAFRAS DO ESTADO DE SÃO PAULO 144

RESUMO.....	144
-------------	-----

INTRODUÇÃO.....	145
-----------------	-----

MATERIAL E MÉTODOS.....	146
-------------------------	-----

1. Amostras.....	146
------------------	-----

2. Avaliação das características agronômicas.....	147
---	-----

3. Padrões de fumonisinas B ₁ e B ₂	147
---	-----

4. Análise das fumonisinas.....	148
---------------------------------	-----

5. Descontaminação do material.....	149
-------------------------------------	-----

6. Análise estatística.....	149
-----------------------------	-----

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	150
-----------------------------	-----

1. Incidência de fumonisinas em milho cultivado em diferentes safras	150
--	-----

2. Influência dos fatores climáticos na produção de fumonisinas.....	155
--	-----

CONCLUSÕES.....	159
-----------------	-----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	160
---------------------------------	-----

CONCLUSÕES.....	165
-----------------	-----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Níveis de fumonisinas em milho das safras de 1988 a 1991 em Iowa, Wisconsin e Illinois, Estados Unidos.	17
TABELA 2. Sistemas solventes para desenvolvimento em camada delgada de sílica gel e C ₁₈ para determinação de fumonisinas.	40
TABELA 3. Tempo de retenção em cromatografia líquida de alta eficiência para fumonisina B ₁ em diferentes fases móveis.	72
TABELA 4. Solventes testados com coluna de fase reversa tipo octadecilsilil, para limpeza de extratos de milho na determinação de fumonisinas.	78
TABELA 5. Relação e características dos cultivares de milho avaliados nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, Estado de São Paulo, na safra de 94/95.	92
TABELA 6. Recuperação de amostras de milho enriquecidas com fumonisinas B ₁ e B ₂ como controle nas análises das amostras de milho cultivados nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga durante a safra de 94/95.	96
TABELA 7. Incidência de fumonisinas B ₁ e B ₂ em 35 cultivares de milho plantados nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, na safra de 94/95.	99
TABELA 8. Condições ambientais nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, durante o crescimento do milho na safra de 94/95.	104

TABELA 9. Relação e características dos cultivares de milho avaliados nas Estações Experimentais do Instituto Agrônomo em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, Estado de São Paulo, na safra de 97/98.	119
TABELA 10. Relação e características dos cultivares de milho avaliados em apenas uma das Estações Experimentais do Instituto Agrônomo (Capão Bonito, Ribeirão Preto ou Votuporanga) na safra de 97/98.	120
TABELA 11. Recuperação de amostras de milho enriquecidas com fumonisinas B ₁ e B ₂ como controle nas análises das amostras de milho cultivadas nas Estações Experimentais do Instituto Agrônomo durante a safra de 97/98.	124
TABELA 12. Médias de fumonisinas B ₁ e B ₂ e em cultivares de milho avaliados Nas Estações Experimentais do Instituto Agrônomo em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, na safra de 97/98.	127
TABELA 13. Médias de fumonisinas B ₁ e B ₂ em cultivares de milho avaliados avaliados nas Estações Experimentais do Instituto Agrônomo, na safra de 97/98.	128
TABELA 14. Condições ambientais nas Estações Experimentais do Instituto Agrônomo em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, do plantio à colheita do milho na safra de 97/98.	134
TABELA 15. Relação e características dos cultivares de milho avaliados consecutivamente nas Estações Experimentais do Instituto Agrônomo em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, nas safras de 94/95 e 97/98.	147

TABELA 16. Resultados da análise de variância conjunta dos dados de fumonisinas B_1 e B_2 , das safras de 94/95 e 97/98, nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga.	151
TABELA 17. Médias de fumonisinas B_1 e B_2 em oito cultivares de milho colhidos nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, nas safras de 94/95 e 97/98.	152
TABELA 18. Médias de fumonisinas de três locais (Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga) nas safras de 94/95 e 97/98 em oito cultivares de milho. ...	153

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura química das principais fumonisinas	14
FIGURA 2. Cromatograma das fumonisinas B ₁ e B ₂ . Condições cromatográficas: coluna (250 mm x 4,6 mm) Varian (Walnut Creek, CA) empacotada com Microsorb-MV 5 µm ODS de fase reversa; fase móvel composta por acetonitrila:água:ácido acético glacial (50+50+0,5) até 15 minutos, seguida por acetonitrila pura; comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 nm e 440 nm; vazão de 1,0 mL/min.	73
FIGURA 3. Cromatograma da amostra de milho naturalmente contaminada com FB ₁ e FB ₂ . Condições cromatográficas: coluna (250 mm x 4,6 mm) Varian (Walnut Creek, CA) empacotada com Microsorb-MV 5 µm ODS de fase reversa; fase móvel composta por acetonitrila:água:ácido acético glacial (50+50+0,5) até 15 minutos, seguida por acetonitrila pura; comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 nm e 440 nm; vazão de 1,0 mL/min.	73
FIGURA 4. Reação da amina primária da fumonisina com o o-ftaldialdeído (OPA) na presença de 2-mercaptoetanol para formar um derivado N-substituído 1-cianobenz(f)isoindol.	74
FIGURA 5. Efeito do tempo de reação na derivação da fumonisina B ₁ com OPA, à temperatura ambiente. Cada ponto representa a média de determinações em triplicata.	75
FIGURA 6. Efeito da temperatura de reação da fumonisina B ₁ com OPA. Cada ponto representa a média de determinações em triplicata.	76
FIGURA 7. Curva padrão de FB ₁ de 20 a 10.000 ng/g.	80

FIGURA 8. Curva padrão de FB ₂ de 40 a 10.000 ng/g.	81
FIGURA 9. Distribuição de freqüência da contaminação por fumonisinas B ₁ e B ₂ das amostras de 35 cultivares de milho obtidos em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, na safra de 94/95.	97
FIGURA 10. Fumonisinas totais nos diferentes tipos de cultivares nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito (CB), Ribeirão Preto (RP) e Votuporanga (VO), na safra de 94/95. (HS = híbrido simples; HSm = híbrido simples modificado; HT = híbrido triplo e HTm = híbrido triplo modificado).	100
FIGURA 11. Fumonisinas totais em cultivares de milho agrupados conforme o tipo de endosperma, em amostras de Capão Bonito (CB), Ribeirão Preto (RP) e Votuporanga (VO), na safra de 94/95.	101
FIGURA 12. Fumonisinas totais em cultivares de milho agrupados de acordo com O ciclo, em amostras de Capão Bonito (CB), Ribeirão Preto (RP) e Votuporanga (VO), na safra de 94/95.	102
FIGURA 13. Temperaturas máximas (médias mensais) do plantio à colheita nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito (CB), Ribeirão Preto (RP) e Votuporanga (VO), na safra de 94/95.	105
FIGURA 14. Temperaturas mínimas (médias mensais) do plantio à colheita nas Estações Experimentais o Instituto Agronômico em Capão Bonito (CB), Ribeirão Preto (RP) e Votuporanga (VO), na safra de 94/95.	106

FIGURA 15. Índice pluviométrico (média diária) do plantio à colheita nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito (CB), Ribeirão Preto (RP) e Votuporanga (VO), na safra de 94/95.	107
FIGURA 16. Estações Experimentais utilizadas em 1997/98 no Estado de São Paulo: (1) Capão Bonito, (2) Ribeirão Preto e (3) Votuporanga.	118
FIGURA 17. Distribuição de frequência da contaminação por fumonisinas B ₁ e B ₂ em 52 cultivares de milho nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, na safra de 97/98.	125
FIGURA 18. Níveis médios de contaminação fumonisinas B ₁ e B ₂ nos cultivares de milho analisados nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito (CB), Ribeirão Preto (RP) e Votuporanga (VO), na safra de 97/98.	129
FIGURA 19. Níveis médios de fumonisinas totais nos tipos de cultivares de milho com nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito (CB), Ribeirão Preto (RP) e Votuporanga (VO), na safra de 97/98. (HS = híbrido simples e HSm = híbrido simples modificado).	130
FIGURA 20. Níveis médios de fumonisinas totais em cultivares de milho com diferentes tipos de endosperma nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito (CB), Ribeirão Preto (RP) e Votuporanga (VO), na safra de 97/98.	131

FIGURA 21. Níveis médios de fumonisinas totais em cultivares de milho com diferentes tipos de ciclo vegetativo nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito (CB), Ribeirão Preto (RP) e Votuporanga (VO), na safra de 97/98.	132
FIGURA 22. Temperaturas máximas (T _{Ma}), médias (T _{Me}) e mínimas (T _{Mi}) do plantio à colheita na Estação Experimental do Instituto Agronômico em Capão Bonito, na safra de 97/98.	135
FIGURA 23. Temperaturas máximas (T _{Ma}), médias (T _{Me}) e mínimas (T _{Mi}) do plantio à colheita na Estação Experimental do Instituto Agronômico em Ribeirão Preto, na safra de 97/98.	136
FIGURA 24. Temperaturas máximas (T _{Ma}), médias (T _{Me}) e mínimas (T _{Mi}) do plantio à colheita na Estação Experimental do Instituto Agronômico em Votuporanga, na safra de 97/98.	136
FIGURA 25. Índice pluviométrico (média diária) do plantio à colheita nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito (CB), Ribeirão Preto (RP) e Votuporanga (VO), na safra de 97/98.	138
FIGURA 26. Distribuição de frequência da contaminação por fumonisinas em oito cultivares de milho das Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, nas safras de 94/95 e 97/98.	154
FIGURA 27. Temperaturas máximas (T _{Ma}) e temperaturas mínimas (T _{Mi}) do plantio à colheita na Estação Experimental do Instituto Agronômico em Capão Bonito, nas safras de 94/95 e 97/98.	155

FIGURA 28. Temperaturas máximas (T _{Ma}) e temperaturas mínimas (T _{Mi}) do plantio à colheita na Estação Experimental do Instituto Agronômico em Ribeirão Preto, nas safras de 94/95 e 97/98.	156
FIGURA 29. Temperaturas máximas (T _{Ma}) e temperaturas mínimas (T _{Mi}) do plantio à colheita na Estação Experimental do Instituto Agronômico em Votuporanga, nas safras de 94/95 e 97/98.	156
FIGURA 30. Índice pluviométrico (IP) do plantio à colheita na Estação Experimental do Instituto Agronômico em Capão Bonito, nas safras de 94/95 e 97/98.	157
FIGURA 31. Índice pluviométrico (IP) do plantio à colheita na Estação Experimental do Instituto Agronômico em Ribeirão Preto, nas safras de 94/95 e 97/98.	158
FIGURA 32. Índice pluviométrico (IP) do plantio à colheita na Estação Experimental do Instituto Agronômico em Votuporanga, nas safras de 94/95 e 97/98.	158
FIGURA 33. Umidade relativa do ar (UR) do plantio à colheita na Estação Experimental do Instituto Agronômico em Ribeirão Preto, nas safras de 94/95 e 97/98.	159

RESUMO

Fumonisinás são metabólitos tóxicos produzidos principalmente por cepas de *Fusarium moniliforme* e *F. proliferatum*. Essas toxinas são capazes de causar leucoencefalomalácia equina (LEME), edema pulmonar e hidrotórax em suínos (EPS), câncer hepático em ratos e leucoencefalomalácia e hemorragia cerebral em coelhos. Em alguns países como África do Sul, China e Itália sua presença em alimentos foi correlacionada com câncer de esôfago em humanos e uma maior incidência de arteriosclerose na população. Os objetivos deste trabalho foram: avaliar um conjunto de técnicas já existentes relatadas na literatura e julgadas promissoras para determinação de fumonisinás B₁ e B₂ em milho; uma vez escolhido o método analítico, proceder a sua otimização e adequação para as condições de trabalho encontradas em laboratórios brasileiros; estudar o comportamento de cultivares de milho plantados no Estado de São Paulo em duas safras não consecutivas quanto a produção de fumonisinás B₁ e B₂ e estudar a influência das características dos cultivares e das condições climáticas nos locais de plantio com relação a produção de fumonisinás. Vários sistemas de extração e limpeza foram avaliados e o método preconizado pela AOAC Internacional foi considerado o mais adequado, com algumas modificações. Os limites de detecção obtidos foram 0,02 µg/g para FB₁ e 0,04 µg/g para FB₂ e o desvio padrão médio entre duplicatas foi 0,6% para FB₁ e 2,2% para FB₂. Duzentos e quinze amostras, representando 35 cultivares de milho na safra de 94/95 e 52 cultivares na safra de 97/98, com diferentes tipos de cultivares, de endosperma e do ciclo até o florescimento foram analisadas. Todos os cultivares estavam contaminados com fumonisinás em níveis que variaram de 0,13 µg/g a 6,58 µg/g para FB₁ e de 0,06 µg/g a 2,15 µg/g para FB₂ durante a safra de 94/95. Na safra de 97/98 os níveis de contaminação variaram de 1,15 µg/g a 43,80 µg/g para FB₁ e de 0,08 µg/g a 11,65 µg/g para FB₂. Mais de 76% das amostras de 94/95 e mais de 67% das amostras de 97/98 continham níveis de fumonisinás acima de 1,0 µg/g. Estes resultados colocam o milho plantado no Estado de São Paulo entre os mais contaminados do mundo. Não foi observada correlação entre contaminação por fumonisinás e tipos de germoplasma, de endosperma, ou duração do ciclo vegetativo. Foi observada uma forte interação entre a contaminação por fumonisinás e o local de plantio dos cultivares analisados. Houve

diferença significativa entre as temperaturas mínimas registradas nas Estações Experimentais estudadas, no entanto não foi observada correlação entre temperatura ambiente e contaminação por fumonisinas. Foi observada correlação negativa ($r = -0,96$ e $-0,99$) entre índice pluviométrico após o florescimento feminino e concentração de fumonisinas nas safras de 94/95 e 97/98, respectivamente. A comparação dos resultados da incidência de fumonisinas em dois anos por região indica uma grande diferença de comportamento dos cultivares quanto ao acúmulo de fumonisinas. Ficou evidenciada a necessidade de empregar mais de um ano agrícola para observar a resistência dos cultivares de milho ao *Fusarium*, bem como a experimentação regional na caracterização de genótipos mais adaptados e/ou resistentes em cada condição edafoclimática. As diferenças nos níveis de fumonisinas encontrados em algumas amostras em diferentes Estações Experimentais, sugerem a possibilidade da seleção de cultivares para uso em locais específicos.

Palavras chave – fumonisinas, milho, micotoxinas, *Fusarium*.

SUMMARY

Fumonisin are toxic metabolites produced mainly by strains of *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum*. They are capable of causing equine leukoencephalomalacia, porcine pulmonary edema and hydrothorax, hepatic cancer in mice and leukoencephalomalacia and brain hemorrhage in rabbits. In countries such as South Africa, China and Italy its presence in foods have been correlated to esophageal cancer and a higher incidence of arteriosclerosis in the population. The objectives of the present work were: evaluate the existing analytical methods for the determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn; after choosing the analytical method to proceed to optimize and adequate it to the conditions prevailing in Brazilian laboratories; to study the behavior of corn cultivars planted in the State of São Paulo during two non consecutive growing seasons for the production of fumonisins B₁ and B₂; and to study the effect of agronomic characteristics and climatic conditions on the production of fumonisins. Several systems for extraction and sample cleanup were evaluated and the method adopted by the AOAC International with modifications was chosen as the most adequate for the work intended. The limits of detection were 0.02 µg/g for FB₁ and 0.04 µg/g for FB₂ and the average standard deviation between duplicates was 0.6% for FB₁ and 40 ng/g for FB₂. Two hundred and fifteen samples were analyzed, comprising 35 corn cultivars and 52 cultivars during the growing seasons of 94/95 and 97/98, respectively, with different types of cultivars, endosperm and length of vegetative cycle. All samples from the growing season of 94/95 were contaminated with fumonisins at levels ranging from 0.13 µg/g to 6.58 µg/g for FB₁ and from 0.06 µg/g to 2.15 µg/g for FB₂. The levels of contamination in the growing season of 97/98 ranged from 1.15 µg/g to 43.80 µg/g for FB₁ and from 0.08 µg/g to 11.65 µg/g for FB₂. Over 76% of the 94/95 samples and over 67% of the 97/98 samples were contaminated above 1.0 µg/g with fumonisins. These results place the corn grown in the State of São Paulo among the most contaminated in the world. No correlation was found between the contamination and types of germoplasm, endosperm, or length of vegetative cycle. A strong interaction between fumonisins contamination and the corn growing location was observed. There was a significant difference between the experimental stations

minimum temperatures but there was no correlation between the overall temperatures and the contamination. A negative correlation ($r = -0.96$ and -0.99) was observed between rainfall after silk emergence and levels of fumonisins in the samples for the growing periods of 94/95 and 97/98, respectively. The cultivars exhibited a diversified behavior towards the accumulation of fumonisins when the two growing periods studied are compared and the results point towards the importance to evaluate cultivars in this respect for more than one growing season. Tests conducted at different locations are also important for the selection for each specific region of the best adapted cultivars in terms of greater resistance to fumonisins accumulation. The different levels of fumonisins found in samples from the experimental stations suggest the possibility of selection of cultivars for use in specific areas.

Key words: fumonisins, corn, mycotoxins, *Fusarium*

INTRODUÇÃO

O milho se destaca entre as graníferas por ser o primeiro em área cultivada e volume de produção no país e pela participação preponderante das empresas privadas na pesquisa, produção e comercialização das sementes melhoradas. É cultivado em uma vasta área no país, 13 milhões de hectares, com uma produção anual em torno de 32 milhões de toneladas. Os maiores produtores são os Estados do Paraná, Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Só no Estado de São Paulo, nos três últimos anos agrícolas, cultivou-se em torno de 1,2 milhões de hectares de milho.

O milho, é constantemente exposto ao risco de invasão de fungos toxigênicos, principalmente dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Estes fungos são produtores de micotoxinas, e várias micotoxicoses relacionadas a milho infectado já foram relatadas em animais e em humanos. Algumas espécies de *Fusarium* já foram isoladas de milho, trigo, arroz e rações, procedentes de vários Estados brasileiros, em proporções variadas, com predominância de *Fusarium moniliforme* e *F. graminearum*. O milho é o produto agrícola mais freqüentemente infectado pelo *F. moniliforme*, uma espécie cosmopolita, saprófita, que produz infecções assintomáticas.

F. moniliforme Sheldon, *F. proliferatum* Seção Liseola e *F. nygamai*, são as espécies do gênero *Fusarium* produtoras de um grupo de micotoxinas chamadas de fumonisinas. Esta família de toxinas foi descoberta em 1988 por um grupo de pesquisadores da África do Sul. A FB₁ é a mais importante do grupo, constituindo até 70% do total das fumonisinas, produzidas tanto em cultivos, quanto em milho naturalmente contaminado.

As fumonisinas são toxinas capazes de causar leucoencefalomalácia equina (LEME), edema pulmonar e hidrotórax em suínos (EPS), câncer hepático em ratos e leucoencefalomalácia e hemorragia cerebral em coelhos. As fumonisinas também são associadas com alimentos a base de milho consumidos por humanos. Os altos níveis de fumonisina B₁ em milho utilizado na dieta humana em algumas localidades da África do Sul e no norte da China, tem sido apontado como possível causa da alta incidência de câncer de esôfago nas populações envolvidas. A propriedade carcinogênica é atribuída também, a outros componentes do grupo como FB₂ e FB₃.

Levantamentos sobre a incidência de fumonisinas em milho tem sido conduzidos em várias partes do mundo e contaminação tem sido encontrada nos mais variados níveis. Vários trabalhos relataram a presença do *F. moniliforme* no milho brasileiro e alguns, a existência de surtos de LEME nos Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais e Paraná. Em alguns casos foi constatada a presença de FB₁ nas rações que levaram a óbitos de equinos. As toxinas FB₁ e FB₂ foram encontradas em amostras de milho comercial provenientes do Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás.

Informações sobre o milho cultivado em São Paulo são necessárias. Paralelamente, poucas são as informações sobre os fatores que favorecem a produção de fumonisinas em milho. Vários autores tem indicado a existência de diferenças nos cultivares de milho em relação à infecção pelo *F. moniliforme* e que a resistência é uma herança genética. Um outro aspecto que precisa ser estudado é a influência dos fatores climáticos na produção de fumonisinas.

Devido ao amplo potencial de contaminação do milho e derivados com fumonisinas, métodos analíticos que monitorem os níveis de fumonisinas nos produtos agrícolas são de grande interesse. Este fato é reforçado pelas necessidades de fiscalização do cereal e seus produtos originados interna ou externamente. É também possível que a pobreza de informações sobre a incidência de fumonisinas no Brasil advenha exatamente das dificuldades encontradas no país com a metodologia analítica. Diante deste quadro os objetivos do presente trabalho foram: (1) avaliar um conjunto de técnicas já existentes relatadas na literatura e julgadas promissoras para determinação de fumonisinas B₁ e B₂ em milho; (2) uma vez escolhido o método analítico, proceder à sua otimização e adequação para as condições de trabalho encontradas em laboratórios brasileiros; (3) estudar o comportamento de cultivares de milho plantados no Estado de São Paulo em duas safras não consecutivas quanto a produção de fumonisinas B₁ e B₂ e (4) estudar a influência das características dos cultivares e das condições climáticas nos locais de plantio com relação a produção de fumonisinas.

REVISÃO DA LITERATURA

1. MILHO

O milho, cientificamente designado *Zea mays* L., é uma planta alta, robusta, monocotiledônea, pertencente à família das gramíneas, largamente utilizada como fonte de alimento em vários países (FANCELLI, 1983).

Provavelmente originado no México, o milho é um dos cereais que se desenvolveu e se adaptou a condições bastante diversas em termos de temperatura, umidade, duração da estação livre de geadas e de outras condições ambientais. Por este motivo ele é cultivado desde o Norte do Canadá até o Sul da Argentina (WATSON & RAMSTAD, 1987).

Na constituição do milho há, em média, 60% de carboidratos, 10% de proteínas, 4% de lipídeos, além de minerais e vitaminas (FANCELLI, 1983). Tal composição faz com que este cereal seja utilizado no preparo de mais de 500 derivados (NOGUEIRA JÚNIOR *et alii*, 1987), sendo a base de produtos alimentares diversificados, bem como relevante fator sócio-econômico para muitas regiões do mundo.

A ampla utilização do milho na alimentação é a causa principal do seu grande consumo tanto pelos países produtores quanto pelos importadores. Estima-se que nos países desenvolvidos, a utilização anual de grãos gire ao redor de 1000 kg/per capita, sendo 930 kg, indiretamente, na forma de ração para produção de carne e leite e 70 kg, diretamente, na dieta humana. Já, em países pobres da Ásia, o consumo per capita é de 150 kg, quase todo na forma de grãos *in natura* (MORICOGHI *et alii*, 1989).

No Brasil, o papel do milho na alimentação humana e animal é importante e antigo. Mesmo antes da chegada dos colonizadores ao país, o milho já era cultivado e utilizado pelos indígenas. Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, logo após a China, e os Estados Unidos, tendo sua produção ficado, de 1991 a 1996, em torno de 32 milhões de toneladas (TSUNECHIRO & OKAWA, 1996).

O milho é cultivado em uma área com cerca de 13 milhões de hectares, tendo uma produção anual em torno de 32 milhões de toneladas. No Estado de São Paulo, o milho é uma das mais importantes culturas, ultrapassando 1,2 milhões de hectares cultivados (IBGE, 1996).

O destino da produção brasileira atinge diversos setores, sendo a suinocultura e a avicultura responsáveis pela maior parte da utilização dos grãos (41%). O milho entra como matéria-prima básica na formulação das rações destinadas a essas criações. O restante da produção divide-se entre a indústria de alimentos (13,5%), formulação de rações de outras espécies animais (5,6%) e produção de sementes (0,6%). A não comercialização de 40% dos grãos produzidos deve-se, principalmente, ao consumo na propriedade rural, na ordem de 24,7%. O restante dessa não comercialização, deve-se ao consumo humano nas grandes cidades (4,4%) e às perdas durante a colheita e armazenamento, responsáveis por 9,9% do total produzido no país (PEDROSA & DEZEN, 1991).

Dos possíveis derivados do milho, os mais tradicionais, utilizados na alimentação humana no Brasil, são a farinha de milho e o fubá. Entretanto, novos produtos têm surgido para atender uma faixa de consumidores mais reduzida e exigente (NOGUEIRA JÚNIOR *et alii*, 1987).

2. MICROBIÓTA FÚNGICA DO MILHO

Todos os grãos de cereais são expostos, no campo, a uma ampla variedade de organismos, provenientes da poeira, água, plantas doentes, insetos, solo, fertilizantes e material orgânico de animais. Entretanto, o número e os tipos de microrganismos encontrados nos grãos vão depender da resistência dos mesmos, bem como do tipo de solo, insetos, roedores e especialmente das condições climáticas durante e imediatamente após a colheita (SILLIKER & ELLIOTT, 1980). A superfície externa dos grãos na colheita contém centenas de espécies microbianas, porém somente algumas são capazes de invadir o grão e promover a sua deterioração (SEMENIUK, 1954).

A contaminação fúngica parece ser a causa mais freqüente da inevitável perda de qualidade dos grãos e sementes. Esta contaminação pode fazer com que os grãos tornem-se impróprios para o consumo, resultando em grandes perdas econômicas (PASTER & BULLERMAN, 1988). Os fungos podem causar uma série de danos aos grãos durante o plantio e a colheita, bem como durante o armazenamento (SILLIKER & ELLIOTT, 1980). Os efeitos da invasão fúngica incluem a diminuição do poder de germinação, emboloramento visível, descoloração, odor desagradável, perda de matéria seca, aquecimento, cozimento, mudanças químicas e nutricionais, perda da qualidade e produção de micotoxinas (POMERANZ, 1982).

Segundo CHRISTENSEN & SAUER (1982) os fungos que infectam os grãos de sementes, de maneira geral, podem ser divididos em dois grupos ecológicos, de acordo com o momento da contaminação: os chamados Fungos de Campo e os Fungos de Armazenamento.

Os Fungos de Campo, assim chamados por invadirem os tecidos da planta em crescimento no campo, requerem, para seu desenvolvimento, elevada umidade relativa do ar (80%) e altos teores de umidade nos grãos (20–21%). Quando os teores de umidade declinam abaixo de 21%, onde nenhuma água livre está disponível no interior dos grãos, os Fungos de Campo aparentemente morrem e os Fungos de Armazenamento aparecem. Os Fungos de Armazenamento, que proliferam nos produtos já armazenados, necessitam de teores de umidade ao redor de 16% (CHRISTENSEN & SAUER, 1982).

O gênero *Fusarium* pertence a classe dos *Hyphomycetes* e taxonomicamente esses fungos são estudados nas suas formas anamórficas, embora, em várias espécies, já seja conhecido seu estado teleomórfico. Segundo NELSON *et alii* (1983), as espécies do gênero, consideradas as mais importantes e as mais freqüentemente isoladas, estão agrupadas em 12 Seções que compreendem 30 espécies. Na sua grande maioria, são fungos com uma distribuição mundial, sendo alguns deles parasitas de plantas, e outros toxigênicos ou não, reconhecidamente patógenos para homens e animais (SAMSON & VON REENEN-HOEKSTRA, 1988).

MILLS (1989) cita as espécies de *Fusarium* como as principais invasoras de grãos de milho no campo, causando, inclusive, várias doenças, como, podridão da semente e colmos. Dentro do gênero *Fusarium*, as espécies fúngicas mais comuns no campo são *F. moniliforme* e *F. subglutinans*, espécies freqüentemente responsáveis pelo apodrecimento da espiga de milho mas, comumente, estas duas espécies causam apodrecimento de grãos individuais ou de áreas localizadas nos grãos. A contaminação pode ser iniciada através de danos causados por chuva de granizo, insetos e pássaros. Estes fungos aparecem, comumente, contaminando o grão junto ao embrião, embora algumas vezes os sinais desta contaminação não seja visível (SUTTON, 1982).

F. graminearum e *F. culmorum* são as espécies de *Fusarium* com maior patogenicidade (capacidade de causar doenças) e com maior agressividade (quantidade de doença causada). *F. graminearum* é significativamente mais agressivo no caule do milho do que *F. subglutinans* e *F. moniliforme* (GILBERTSON *et alii*, 1985). Evidências colhidas em outros países apontam o *F. moniliforme* como endêmico no milho (MILLER, 1994). Porém, os fatores que controlam a doença não estão ainda estabelecidos e precisam ser estudados.

Em milho, os esporos provenientes da terra, ervas daninhas ou capim próximas dos campos de milho seriam transportados pelo ar e se distribuiriam sobre as espigas de milho, atingindo os grãos. Os esporos seriam levados pela água, insetos, aves, e orifícios na palha causados por lagartas. A colonização ocorreria dentro de uma faixa adequada de umidade e temperatura. Estudos utilizando microscopia eletrônica de varredura observaram que os fungos se localizam no pedicelo dos grãos aparentemente sadios. As hifas dos fungos não foram encontradas dentro do embrião ou endosperma dos grãos aparentemente sadios, entretanto, nos grãos associados com fumonisinas o embrião e o endosperma apresentaram-se invadidos pelos fungos (BACON & WILLIAMSON, 1992).

Espécies de *Fusarium* são comumente isoladas do milho, antes e após a colheita e eventualmente durante a armazenagem (CORREA *et alii*, 1992). Estes fungos também têm sido isolados de derivados do milho (MARASAS & SMALLEY, 1972) e de outros cereais

(arroz) assim como, sorgo, cana-de-açúcar, feno (CLEVSTROM, 1986) e substratos diversos (THIEL *et alii*, 1991). Também ocorre em bananas, abacaxis e tomates estocados. O *Fusarium* é menos freqüente em rações (PURCHIO *et alii*, 1988), exceto naquelas envolvidas com episódios de leucoencefalomalácia eqüina - LEME (HIROOKA *et alii*, 1990).

Estudos desenvolvidos na África do Sul (MARASAS *et alii*, 1979), em Zâmbia (MARASAS *et alii*, 1978), e várias outras regiões produtoras de milho, demonstraram a prevalência do *F. moniliforme* em grãos de milho recém-colhido. Na África do Sul, a freqüência de aparecimento de cada espécie é influenciada pela localização geográfica e clima. Esta influência foi bem demonstrada por MARASAS *et alii* (1979). Neste trabalho os autores verificaram a incidência de espécies de *Fusarium* em três áreas daquele país. O *F. moniliforme* predominou na região mais quente, sub-tropical, enquanto o *F. subglutinans* prevaleceu na região mais fria, temperada, e o *F. graminearum*, por sua vez apareceu com uma incidência maior na região de clima intermediário.

Segundo 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. *F. subglutinans* e *F. moniliforme* são muito comuns em milho no Canadá, Estados Unidos, e Europa, *F. graminearum* é também importante no norte dos Estados Unidos e Canadá e em partes da Europa, mas no leste europeu o *F. culmorum* é mais comum (ABBAS *et alii*, 1988b).

LILLEHOJ & ZUBER (1988) analisaram vários tipos de grãos de milho submetidos a secagem logo após a colheita, provenientes de diferentes países. Os autores verificaram que 92% das amostras provenientes do Brasil estavam contaminadas por *Fusarium spp*, 25% por *Penicillium spp*, 8% por *Aspergillus spp*, sendo, neste último, 4% por *Aspergillus niger*.

Na América do Norte e em alguns países da Europa, as espécies de *Fusarium* mais freqüentemente isoladas em milho têm sido, *F. graminearum* e *F. moniliforme* seguidas por *F. culmorum* e *F. subglutinans*. ABBAS *et alii* (1988a) isolaram *Fusarium spp* em grãos de milho provenientes de 32 campos produtores em Minnesota, Estados Unidos, tendo como

predominantes: *F. graminearum* (30%), *F. subglutinans* (23%), *F. moniliforme* (20%), *F. oxysporum* (14%) e *F. proliferatum* (12%). NELSON (1992), em estudo feito com grãos de milho recém-colhido de diversas regiões dos Estados Unidos, verificou que o *F. moniliforme* foi o fungo mais freqüentemente isolado, tendo aparecido em quase 100% das amostras.

JULIAN *et alii* (1995), analisando 69 amostras de grãos de milho recém-colhido e armazenado de quatro regiões de Honduras, observaram que os fungos mais freqüentemente isolados foram, nesta ordem: *F. moniliforme*, *F. subglutinans*, *Penicillium spp*, *Stenocarpella maydis*, *S. macrospora* e *Acremonium spp*.

GONZÁLEZ *et alii* (1995), estudando a microbiota de 178 amostras de grãos de milho recém-colhido, provenientes de cinco diferentes regiões da Argentina, observaram que os gêneros *Fusarium* e *Penicillium* foram os mais prevalentes nas cinco regiões, sendo *F. moniliforme* a espécie mais freqüente.

No Brasil, algumas espécies de *Fusarium* já foram isoladas, em proporções variadas, de milho, trigo, arroz e rações, procedentes de vários estados brasileiros, com predominância de *F. moniliforme* e *F. graminearum* (SALGADO & CARVALHO, 1980). Segundo WENTZ *et alii* (1981), 90% das amostras de milho e de rações, para suínos e aves, no Estado de Santa Catarina, estavam contaminadas com *Fusarium spp*. FIORENTIM (1985) não detectou *Fusarium spp* em 23 amostras de rações e ingredientes utilizados na alimentação de aves, no Estado de Santa Catarina. ASEVEDO (1988) trabalhando com 90 amostras de milho procedentes de várias regiões do Brasil, encontrou *Fusarium spp* em 62,2% das amostras. PURCHIO *et alii* (1988) encontraram 2,8% de positividade, em 140 amostras de rações para gado leiteiro, procedentes do Rio Grande do Sul e de São Paulo. CORREA *et alii* (1992), verificaram freqüência de 85,1% de *F. moniliforme*, em milho pós-colheita.

XAVIER *et alii* (1991), analisando grãos de milho relacionados com o quadro de LEME, verificaram que 49,4% das amostras estavam contaminadas por *F. moniliforme*, 25,8% por *Aspergillus spp* e 25,8% por *Penicillium spp*.

MEIRELES *et alii* (1994) analisaram 38 amostras de grãos de milho envolvidos com surtos de LEME tendo encontrado 97,4% de contaminação por *Fusarium spp*, 57,9% por *Penicillium spp* e 36,8% por *Aspergillus spp*. Dentro do gênero *Fusarium*, a espécie *F. moniliforme* (82%) foi a mais encontrada.

POZZI *et alii* (1995), analisando 130 amostras de grãos de milho recém-colhido e armazenado, provenientes de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, verificaram maior frequência de *Fusarium spp* (83,8%), seguido por *Penicillium spp* (55,3%), *Aspergillus spp* (40,7%) e outros 11 fungos filamentosos. Dentro do gênero *Fusarium*, a espécie predominante foi *F. moniliforme* (80,7%), seguido pelo *F. proliferatum* (3,0%).

ORSI (1995), estudando 195 amostras de três híbridos de milho recém-colhido e armazenado, provenientes de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, relacionou a influência dos fatores abióticos (teor de umidade, atividade de água, temperatura média, precipitação pluvial e umidade relativa do ar), na frequência de isolamento da microbiota fúngica. As análises microbiológicas demonstraram que o gênero *Fusarium* foi o mais frequente, seguido dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Com relação ao gênero *Fusarium*, a espécie *F. moniliforme* foi a mais frequente nos três híbridos, principalmente na faixa de 0,70 a 0,79 de atividade de água

CASTRO *et alii* (1995), analisando amostras de grãos de milho recém-colhido, provenientes de diferentes localidades do Estado de São Paulo, durante o ano de 1992, também demonstraram a predominância de invasão por fungos dos gêneros *Fusarium* e *Penicillium*.

3. FUMONISINAS

3.1. Propriedades físicas, químicas e efeitos biológicos

As fumonisinas são um grupo de micotoxinas estruturalmente relacionadas. Foram isoladas pela primeira vez de cultivos de *Fusarium moniliforme*, MRC 826, obtido do

milho em Transkei, África do Sul (GELDERBLOM *et alii*, 1988). Originalmente, BEZUIDENHOUT *et alii* (1988), quando descreveram e caracterizaram quimicamente as estruturas dessas micotoxinas, relacionaram quatro metabólitos FA₁, FA₂, FB₁, FB₂, sendo a série “A” portadora de amidas acetiladas no grupo amina C-2, enquanto a série “B” apresenta uma amina primária livre. Duas outras fumonisinas B₃ e B₄, foram detectadas em cultivos de *F. moniliforme* MRC 826 (PLATTNER *et alii*, 1992) sendo a FB₃, encontrada em rações e alimentos nos EUA (SYDENHAM *et alii*, 1992b). Até o momento, 16 moléculas foram caracterizadas: FB₁, B₂, B₃, B₄, FA₁, A₂, A₃, FAK₁, FC₁, C₃, C₄, FP₁, P₂, P₃, FPH_{1a} e PH_{1b} (MUSSE & PLATTNER, 1997; AH SEO & WON LEE, 1999). A estrutura química das fumonisinas mais freqüentemente encontradas está representada na Figura 1.

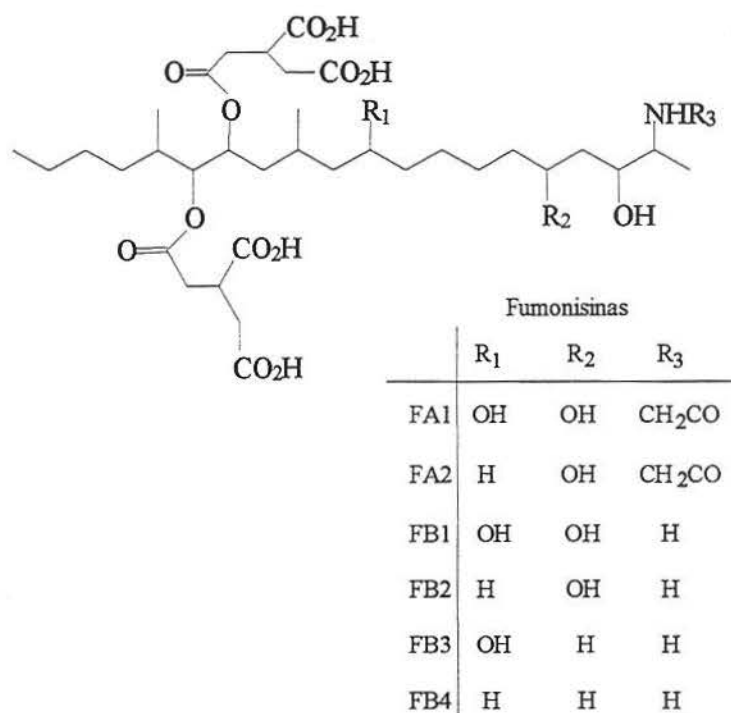


FIGURA 1. Estrutura química das principais fumonisinas.

MARASAS & SMALLEY (1972) administrando farinha de milho experimentalmente contaminada por fungos, entre eles *Fusarium*, a suínos e frangos, verificaram uma diminuição da conversão alimentar, traduzida por perda de peso, sem determinar, no entanto, qual a toxina responsável pelo problema. Quadro semelhante foi observado por GEDEK *et alii* (1978), em surtos de raquitismo de aves, alimentadas com ração contaminada por *F. moniliforme*, quando no entanto, ainda não se conhecia a toxina.

A FB₁ é a mais importante do grupo, constituindo até 70% do total das fumonisinas, tanto em meios de cultura, quanto em milho naturalmente contaminado. Essa micotoxina causa LEME (ROSS *et alii*, 1991a), edema pulmonar e hidrotórax (EPS), em suínos (OSWEILER *et alii*, 1992), hemorragia cerebral em coelhos (BUCCI *et alii*, 1996) e câncer hepático, em ratos (GELDERBLOM *et alii*, 1991). A propriedade carcinogênica é atribuída, também, a outros componentes do grupo como FB₂ e FB₃ (GELDERBLOM *et alii*, 1992). Segundo THIEL *et alii* (1992), níveis de FB₁ e de FB₂, encontrados em milho utilizado na dieta humana, em alguns locais da África do Sul, apresentaram uma estreita relação com o câncer de esôfago da população. As análises detectaram concentrações mais elevadas dos metabólitos nas áreas com maior incidência do problema, em contraste com as amostras de milho procedentes de regiões com baixa incidência da doença (SYDENHAM *et alii*, 1991).

As FB₁ e FB₂ são diésteres do ácido tricarboxílico e dos álcoois poliídricos, com estrutura química muito semelhante à da esfingosina. A semelhança de estrutura entre as FB₁ e FB₂ e a esfingosina, levou alguns pesquisadores a formularem a hipótese de que estas micotoxinas poderiam interferir com o metabolismo da esfingosina (YOO *et alii*, 1992), base do esqueleto químico de todos os esfingolipídeos, como esfingomielina, ceramidas e gangliosídeos. Os esfingolipídeos parecem estar intimamente relacionados com várias funções, como comunicação célula-célula, crescimento, diferenciação e transformação da célula (MERRIL, 1991). Uma quebra na seqüência da biossíntese dos esfingolipídeos poderia trazer severas consequências, com transtornos orgânicos.

O mecanismo de ação das fumonisinas ainda não é perfeitamente conhecido. Entretanto, segundo WANG *et alii* (1991), esses metabólitos têm como principal sítio de

ação algumas etapas importantes do metabolismo dos esfingolipídeos. Esses pesquisadores, quando testaram, *in vitro*, a ação da toxina sobre hepatócitos de rato, constataram que as FB₁ e FB₂ inibiam a incorporação de serina na molécula de esfingosina dos esfingolipídeos celulares, e por outro lado, causavam um aumento da esfinganina, que também é um intermediário biossintetizado. As micotoxinas impediriam a conversão da esfinganina a N-acil-esfinganina, o que, possivelmente, precede a introdução da dupla ligação na esfingosina N-aciltransferase (ceramida sintetase) em fígado de rato, reduzindo a conversão de esfingosina à ceramida.

A potente ação da fumonisina sobre a biossíntese dos esfingolipídeos talvez seja o mecanismo das lesões necróticas dos cérebros de equinos intoxicados com FB₁ (NORRED *et alii*, 1992). As lesões do tecido cerebral, que é rico em esfingolipídeos, podem ser o resultado final da inibição da biossíntese da esfingomielina. A inibição “*de novo*” dos esfingolipídeos, é específica, e o sítio de ação parece estar na ceramida sintetase, que catalisa a última etapa da síntese, quando o aminogruppo da esfingosina é acilado por um acil-CoA graxo, de cadeia longa. Essa seria a forma pela qual a fumonisina causa a LEME nos equinos, promovendo também a formação de tumores em ratos.

3.2. Incidência de fumonisinas e microrganismos produtores

Desde 1971, quando WILSON & MARONPOT reproduziram a doença a partir de milho inoculado artificialmente com *F. moniliforme*, este tem sido citado como a principal espécie do gênero envolvida com LEME. Além das intoxicações em equinos, o *F. moniliforme* tem sido responsabilizado por problemas respiratórios em suínos. A EPS, descrita por KRIEK *et alii* (1981), tem sido provocada por *F. moniliforme* frequentemente durante a estação da colheita, nos EUA. No outono de 1989 e inverno de 1990, foram relatadas algumas epizootias de LEME, atingindo vários estados, e numerosos surtos de EPS, restritos às regiões centrais, nos EUA (ROSS *et alii*, 1991a).

Um dos primeiros relatos de contaminação natural de milho pela FB₁ foi descrito por SYDENHAM *et alii* (1990a). A partir do extrato submetido à cromatografia líquida de

alta eficiência (CLAE) e, na sequência, com a utilização de cromatografia gasosa e espectroscopia de massas (CG-EM), esses pesquisadores confirmaram a identidade da fração de ácido tricarbálico, presente no hidrolisado da fumonisina.

Linhagens de *F. proliferatum*, Seção Liseola (NELSON *et alii*, 1983) isoladas de casos de LEME e de EPS, mostraram-se produtoras de FB₁ (ROSS *et alii*, 1992). THIEL *et alii* (1991) demonstraram que *F. nygamai*, espécie descoberta por BURGEES & TRIMBOLI (1986), também produz FB₁. Segundo ROSS *et alii* (1992), *F. moniliforme* e *F. proliferatum*, isolados de alimentos envolvidos com LEME eram fortemente produtores de FB₁ e FB₂. O mesmo não foi verificado em relação ao *F. subglutinans* que não sintetizou fumonisinas, embora se tratasse de uma única amostra relacionada com LEME (THIEL *et alii*, 1991).

Num caso ocorrido em uma fazenda no Arizona, EUA, 18 cavalos apresentaram sintomas de intoxicação, e destes 14 (77,8%) morreram. Três amostras de milho foram analisadas e apresentaram contaminação por FB₁ em níveis que variaram de 37 a 122 µg/g (WILSON *et alii* 1990).

MURPHY *et alii* (1993) determinaram o conteúdo de FB₁, FB₂ e FB₃ em milho das safras de 1988 a 1991 e refugo de milho de 1989 em Iowa, Wisconsin e Illinois, Estados Unidos. A concentração de fumonisinas no refugo de milho foi 10 vezes maior que a concentração no milho intacto. Os resultados estão representados na Tabela 1.

TABELA 1. Níveis de fumonisinas em milho das safras de 1988 a 1991 em Iowa, Wisconsin e Illinois, Estados Unidos.

Ano	Número de amostras	Níveis de fumonisinas (µg/g)		
		FB ₁	FB ₂	FB ₃
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)

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

VISCONTI & DOKO (1994) verificaram a produção de FB₁ e FB₂ por 41 linhagens de *Fusarium* isoladas de milho e 17 linhagens de sorgo, trigo, cevada e rações. Todas as linhagens de *F. moniliforme* (uma da França, 10 da Itália, 15 da Polônia e 17 da Espanha) e uma linhagem de *F. proliferatum* produziram FB₁ em quantidades variáveis (0,7–4100 µg/g). Essa mesma variabilidade na produção de FB₁ foi observada em linhagens 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). A maior produção média de FB₁ foi fornecida por isolados de milho (1259 µg/g), seguido de trigo (769 µg/g) e cevada (320 µg/g).

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

FAZEKAS *et alii* (1996) verificaram que o milho cultivado na Hungria estava contaminado com FB₁. Setenta por cento do milho mofado, estocado na forma de espigas, continham uma média de 6,64 µg/g de FB₁ (0,10–52,4 µg/g). Em média, 30% do milho visualmente não afetado pelo fungo estava contaminado com níveis que variaram de 0,06 a

5,1 µg/g de FB₁. Esses autores constataram também a co-ocorrência de outras fusariotoxinas.

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

CHATTERJEE & MUKHERJEE (1994) detectaram pela primeira vez a contaminação natural com FB₁ em milho indiano infectado com *F. moniliforme*. O nível de contaminação variou de 300–366 µg/g.

YOSHIZAWA *et alii* (1996) constataram a presença de FB₁ e FB₂ em 85% das 18 amostras de milho tailandês, colhido nos anos de 1992 e 1993. Oitenta e nove por cento das amostras (16) apresentaram níveis de 0,06 a 18,8 µg/g de FB₁ e 67% das amostras (12) apresentaram níveis de 0,05 a 1,4 µg/g de FB₂.

Fumonisina B₁ foi detectada em 24 das 66 amostras de milho originário de Honduras, na faixa de 0,07 a 6,56 µg/g (JULIAN *et alii*, 1995).

VIQUEZ *et alii* (1996) constataram que FB₁ esteve presente em 89% das amostras referentes às safras de 1992–1993 na Costa Rica. A média de incidência de FB₁ foi de 2,13 µg/g e o máximo valor detectado foi de 6,32 µg/g.

RAMIREZ *et alii* (1996) investigaram a ocorrência de fumonisinas em 50 híbridos comerciais de milho, com diferentes características de endosperma, cultivados na Província de Córdoba, Argentina. A faixa de contaminação encontrada em todos os híbridos analisados foi de 0,18 a 27,05 µg/g para FB₁ e de 0,04 a 9,95 µg/g para FB₂. Dezoito híbridos apresentaram níveis de fumonisinas menores que 1,0 µg/g, o que sugere a possibilidade da seleção de híbridos menos susceptíveis à contaminação por fumonisinas.

SYDENHAM *et alii* (1993) publicaram um estudo, divulgando a ocorrência de FB₁, FB₂ e FB₃ no milho da Argentina e a produção de fumonisinas por *F. proliferatum* e *F. moniliforme* isolados deste milho. Dezesete amostras de milho apresentaram concentrações de fumonisinas variando de 1,58 a 9,99 µg/g. Destas, 16 amostras (94,2%) apresentaram níveis de fumonisinas acima de 2,0 µg/g. Várias destas amostras estavam associadas a casos de LEME.

FB₁ foi pesquisado por ROSS *et alii* (1991b) 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 a 300 µg/g, sendo que em 71% dos casos havia pelo menos uma amostra acima de 100 µg/g. Em um outro estudo, 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 das rações suspeitas de causar EPS mostrou 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, continham FB₁ em níveis abaixo de 8 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 (1,3–16,8 µg/g) e FB₂ (0,1–6,5 µg/g) registrados por THIEL *et alii* (1991). A FB₃ apareceu em níveis que corresponderam de 2,2–18% da concentração de fumonisina total em 12 amostras positivas alertando para o fato que amostras com histórico de LEME devem ser analisadas quanto à presença de FB₁, FB₂ e FB₃.

No Brasil, poucos são os levantamentos sobre a incidência de fumonisinas em milho. As FB₁ e FB₂ foram encontradas em milho, derivados e rações procedentes de estabelecimentos com histórico de LEME e outros tipos de intoxicações. MEIRELES *et alii* (1992) estudaram 29 surtos de LEME nos anos de 1988–1990 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 (82,4%) estavam relacionadas com a ingestão de ração contaminada com FB₁.

Frente à ocorrência de constantes 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 deste Estado. Os resultados

variaram de 0,6 a 12,55 µg/g de FB₁ e de 0 a 10,24 µg/g de FB₂. Ainda neste Estado, na região de Londrina, 21 amostras associadas a casos de micotoxicoses revelaram que 20 (95,2%) continham FB₁ e 18 (85,7%) continham FB₂ (SYDENHAM *et alii*, 1992b).

HIROOKA *et alii* (1996) também investigaram 48 amostras de milho, 39 provenientes do Paraná e 9 do Mato Grosso do Sul e Goiás das safras de 1990–1991. Das amostras analisadas, 97,4% apresentaram-se positivas para FB₁ e 94,8% para FB₂. As amostras provenientes do Paraná continham de 0,6 a 12,55 µg/g de FB₁ e 1,2 a 10,24 µg/g de FB₂. Uma única amostra proveniente de Goiás apresentou 5,83 µg/g de FB₁ e 3,62 µg/g de FB₂. As concentrações de FB₁ em milho naturalmente contaminado cobriram uma faixa com 35,4% entre 5,0 a 7,5 µg/g, seguida por um grupo de 31,2% com 2,5 a 5,0 µg/g. Um total de 4 amostras excederam 10,0 µg/g, valor considerado crítico para o desencadeamento de LEME.

3.3. Avaliação de risco das fumonisinas para humanos

A determinação da ocorrência de fumonisinas em alimentos para consumo humano e animal é importante para estabelecer o risco associado à ingestão destas toxinas. A avaliação da exposição é um dos fatores que contribuem para o estudo da avaliação de risco total, e envolve a frequência ou extensão da contaminação natural e os níveis em que ocorrem esta contaminação. A avaliação da exposição é feita determinando-se a quantidade de um alimento contaminado, consumido por indivíduos em uma determinada comunidade. Indivíduos em uma sociedade relativamente rica consomem milho apenas como componente de uma dieta que consiste de varios itens de diferentes fontes de alimento, exceto onde há consumo de um tipo de comida em particular como pratos tradicionais, tais como polenta no norte da Itália ou canjiquinha em algumas partes dos Estados Unidos. Esta diversidade de tipos e fontes de alimentos não ocorre em áreas rurais, onde se dá essencialmente a cultura de subsistência, e o milho representa o alimento básico da população (SHEPHARD *et alii*, 1996).

Fumonisinias foram analisadas em produtos comerciais à base de milho em um total de 124 amostras provenientes de cinco países (Canadá, Egito, Perú, África do Sul e Estados Unidos) por SYDENHAM *et alii* (1991), com a finalidade de obter dados sobre a exposição dos consumidores desses alimentos a estas toxinas. Os resultados indicaram pela primeira vez que consumidores de alimentos à base de milho nos Estados Unidos e na África do Sul estavam expostos a elevados níveis de fumonisinias.

Um dos primeiros relatos conclusivos sobre a ocorrência de FB₁ em milho e produtos derivados destinados ao consumo humano, foi publicado por SYDENHAM *et alii* (1990b). 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 e foram detectados altos níveis de fumonisinias. Uma amostra de milho proveniente da área de alta incidência de câncer apresentou 44 µg/g de FB₁. Amostras não visivelmente mofadas apresentaram < 10 µg/g de FB₁, mas uma amostra de milho infectado com *Fusarium* apresentou 83 µg/g de FB₁. 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. Em todas as amostras analisadas das áreas de baixa incidência de câncer de esôfago foram detectadas FB₁ e FB₂ em níveis que variaram de 0,45 a 18,9 µg/g e de 0,15 a 6,75 µg/g, respectivamente, e nas áreas de alta incidência de câncer os níveis variaram de 3,45 a 46,9 µg/g e de 0,9 a 16,3 µg/g, respectivamente.

THIEL *et alii* (1992) calcularam a ingestão diária potencial (IDP) de fumonisinias, baseados nos níveis de contaminação natural em milho cultivado em pequenas propriedades em Transkei, África do Sul. Os cálculos realizados assumiram que um adulto de 70 kg consome 460 g de milho/dia, contra apenas 4 g/dia na Suíça (ZOLLER *et alii*, 1994) e na Alemanha e Reino Unido, 7 g/dia (SMITH *et alii*, 1994). Presumindo que este consumo seja de milho “sadio”, a ingestão de fumonisinias será de 14 µg/kg/dia em Transkei, de 0,03 µg/kg/dia na Suíça, e de 0,05 µg/kg/dia na Alemanha e no Reino Unido. Com base nos dados de estudos desenvolvidos em ratos, a ingestão diária tolerável (IDT) para fumonisinias foi calculada em 0,8 µg/kg/dia (GELDERBLUM *et alii*, 1996). Os dados

apresentados mostram claramente que nas comunidades do norte da Europa, as fumonisinas provavelmente não representam um risco para a saúde humana. Entretanto, em comunidades rurais onde o milho constitui o prato principal da dieta, a ingestão de fumonisinas é superior à IDT proposta.

YOSHIZAWA *et alii* (1994) verificaram a ocorrência de FB₁ e FB₂ em 47 amostras de milho coletadas em 1989 nas regiões de Linxian e Shangqiu na Província de Henan, áreas de alto e baixo risco, respectivamente, de câncer de esôfago na população da República da China. A contaminação média no milho de Linxian foi de 0,87 µg/g de FB₁ (0,19–2,96) e 0,46 µg/g de FB₂ (0,30–0,55), enquanto que o milho de Shangqiu apresentou concentração média de 0,89 µg/g de FB₁ (0,20–1,73) e 0,33 µg/g de FB₂ (0,21–0,45). A incidência de contaminação por fumonisina do milho de Linxian (48%) foi aproximadamente 2 vezes maior que o milho da região de Shangqiu (25%) e o milho da região de alto risco (Linxian) foi o que mais frequentemente apresentava contaminação com tricotecenos.

Os níveis de tolerância para fumonisinas em milho e derivados podem ser realísticos, cientificamente sensatos e economicamente razoáveis. Estes níveis podem somente ser estabelecidos se forem baseados em avaliações de exposição e de risco, além dos valores de ingestão diária potencial (IDP) e ingestão diária tolerável (IDT). Se os níveis de tolerância forem muito altos, as saúdes humana e animal podem ser colocadas em perigo (MARASAS *et alii*, 1993). Se os níveis de tolerância forem muito baixos, as consequências econômicas podem ser desastrosas. Níveis < 1,0 µg/g resultarão numa condenação de 34,5% dos produtos de milho comercialmente destinados ao consumo humano nos Estados Unidos (THIEL *et alii*, 1992).

3.4. Estabilidade das fumonisinas e métodos de descontaminação

As micotoxinas são conhecidas pela capacidade de manter por longo tempo sua atividade biológica. No passado, processos físicos, químicos, e biológicos foram estudados com o intuito de salvar produtos agrícolas contaminados usados como alimento animal

(BOTHAST, 1991). Entretanto, restrições tais como viabilidade econômica, redução da concentração das toxinas a níveis seguros, resíduos tóxicos, e retenção do valor nutricional limitaram os tipos de agentes usados com sucesso em um processo de destoxificação em escala comercial.

Os métodos físicos mais estudados para descontaminação de grãos com micotoxinas incluem: limpeza mecânica e lavagem, moagem, separação de grãos contaminados dos não contaminados, e várias formas de tratamento térmico. O sucesso destes métodos depende, da extensão, do grau de contaminação e da distribuição das micotoxinas nos grãos (CHARMLEY & PRELUSKY, 1994).

SYDENHAM *et alii* (1994) consideram que a remoção das partículas (< 3 mm) dos carregamentos de milho, antes do processamento, poderia ser utilizada como um procedimento preliminar de descontaminação. Os dados indicaram que a remoção destas partículas resultou numa redução no conteúdo total de fumonisinas entre 26,2 a 68,4%. Evidências de que as fumonisinas estão associadas com as camadas exteriores dos grãos de milho naturalmente contaminados foram demonstradas por SYDENHAM *et alii* (1995). Estes autores sugerem que a remoção do pericarpo pode ser empregada para a redução dos níveis de fumonisinas em milho contaminado na massa total de grãos.

Em alguns casos, grãos danificados por fungos e contaminados com micotoxinas exibem propriedades físicas diferentes de grãos não danificados e podem ser separados por procedimentos relativamente simples, tais como segregação pela densidade (CHARMLEY & PRELUSKY, 1994).

Os procedimentos de lavagem são empregados como um dos passos de limpeza anterior às operações de moagem úmida ou para grãos a serem usados durante a fermentação etanólica, mas a lavagem não é comercialmente viável quando a moagem é feita a seco devido ao alto custo da secagem dos grãos após a descontaminação (CHARMLEY & PRELUSKY, 1994).

BOTHAST *et alii* (1992) observaram que etanol resultante da fermentação de milho mofado não apresentava fumonisina. 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.

A eficácia das práticas de moagem na redução da concentração de micotoxinas de farinhas produzidas das diferentes frações dos grãos varia de acordo com a distribuição das micotoxinas nos grãos e, em alguns casos, com o grau de contaminação (YOUNG *et alii*, 1986).

Até o momento, vários estudos enfocaram o efeito do processamento térmico sobre o conteúdo de fumonisinas em alimentos. A fervura de extratos de culturas de *F. moniliforme* em milho, por 30 minutos, não reduziu o conteúdo de fumonisinas nesse material e também não reduziu o seu potencial tóxico (ALBERTS *et alii*, 1990). A pasteurização lenta de leite contaminado artificialmente com FB₁ e FB₂, não reduziu o conteúdo de fumonisinas (MARAGOS & RICHARD, 1994). DUPUY *et alii* (1993) estudaram a estabilidade térmica da FB₁ produzida por culturas de linhagens toxigênicas de *F. moniliforme* em milho seco e verificaram que a decomposição térmica seguiu uma reação de primeira ordem. Os autores concluíram que muito provavelmente a FB₁ é uma micotoxina relativamente estável em relação aos procedimentos usados na secagem e processamento do milho. O estudo da termoestabilidade das FB₁ e FB₂ em alimentos a base de milho, revelaram perdas de 60% das toxinas quando o produto seco foi aquecido a 190°C; cerca de 70 a 80% das toxinas não foram recuperadas quando o produto umidificado foi aquecido a 190°C. Ocorreu ainda perda completa sob tratamento térmico a 220°C. De maneira semelhante, estudos conduzidos por SCOTT & LAWRENCE (1994) mostraram que o conteúdo de fumonisinas foi parcialmente reduzido em biscoitos de farinha de milho cozidos a 220°C por 25 minutos. Sugeriram ainda os autores que as perdas observadas no conteúdo de fumonisinas em alimentos processados podem ser devido a dificuldades de recuperação e detecção relacionadas com a matriz. Outro grupo de pesquisadores realizaram estudos sobre os efeitos do tempo e temperatura de processamento na estabilidade da FB₁ em soluções aquosas em 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 (JACKSON *et alii*, 1996). Tratamentos físicos e químicos tem sido combinados para a descontaminação de grãos com toxinas do *Fusarium* (CHARMLEY & PRELUSKY, 1986).

Vários estudos investigaram a aplicação de compostos básicos para o tratamento de milho contaminado com fumonisina. O tratamento em atmosfera amoniacal parece não ser um método eficiente de destoxificação (NORRED *et alii*, 1991). Para a FB₁ não se conhece um local para ataque pela amônia, com a possível exceção da hidrólise do ácido tricarbálico que ocorre com o aquecimento a 60°C de uma solução de fumonisina em hidróxido de potássio a 1 N (PLATTNER *et alii*, 1990). Alguns experimentos indicaram que o tratamento com amônia reduziu os níveis de FB₁ produzida pelo *F. moniliforme* em 90%. Entretanto, mesmo com a mais completa secagem ao ar após o tratamento, os níveis de fumonisina retornaram para 70% ou mais. Não se sabe se o decréscimo transiente nos níveis de fumonisina foi devido a uma interferência pela amônia residual com a extração ou derivação da fumonisina, ou a reversibilidade de uma reação química ou física (NORRED *et alii*, 1991).

Um método alternativo na descontaminação de grãos com micotoxinas é minimizar os efeitos destas, nos animais, pela modificação da dieta contaminada. Tais modificações na dieta tem incluído diluição dos grãos contaminados com grãos não contaminados, melhora no conteúdo nutricional da dieta para compensar a redução na ingestão do alimento, adição de fungos inibidores ou agentes flavorizantes na dieta para melhorar a sua ingestão, adição de agentes potencialmente quelantes às micotoxinas na dieta para inibir a absorção e estimular o metabolismo das micotoxinas pelos animais, dentre outros tratamentos experimentais. A diluição dos grãos contaminados com grãos não contaminados, por causa de sua simplicidade, tem sido um dos métodos mais amplamente utilizados para minimizar os efeitos das toxinas nos animais, particularmente para melhorar a conversão alimentar e ganho de peso em suínos (PATTERSON & YOUNG, 1991).

Entretanto, o sucesso deste método depende do grau de contaminação, da diluição obtida, e da disponibilidade imediata de uma fonte apropriada de grãos não contaminados.

Substâncias investigadas como potenciais agentes quelantes às micotoxinas tem incluído resinas sintéticas trocadoras de íons, zeolitas, bentonita, ou aluminosilicatos (WYATT, 1987). Há algumas evidências de que em alguns casos, estes módulos podem proteger animais contra os efeitos adversos de algumas toxinas do *Fusarium*.

4. FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE FUMONISINAS NO CAMPO

A prevenção contra as micotoxicoses pode ser realizada através de várias medidas: a) adoção de práticas agrícolas corretas de colheita, secagem e armazenamento; b) destoxificação, quando possível, de alimentos contaminados; c) controle dos alimentos em relação à contaminação pelas micotoxinas de maior destaque.

No entanto, a melhor medida para a prevenção de intoxicações por micotoxinas é indiscutivelmente a prevenção do desenvolvimento de fungos em alimentos. Com este objetivo, estudos tem sido desenvolvidos visando determinar em que fase os fungos se desenvolvem durante o crescimento vegetativo, colheita e manuseio subsequente dos produtos agrícolas e quais as condições que favorecem ou inibem o seu desenvolvimento.

O *F. moniliforme* é um contaminante 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. Diversos aspectos da infecção parecem estar sob controle genético (DE LEON & PANDEY, 1989), e a espessura do pericarpo é considerada um fator determinante da resistência à transmissão do fungo para o grão.

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 que ainda não está disponível (RILEY *et alii*, 1993).

Pequenas interações entre milho híbrido ou linhagem de milho com linhagens de *F. graminearum* foram observadas no que diz respeito a infecção da espiga, mas nenhuma classificação importante resultou destas interações (AL-HEETI, 1987). A ausência de tais interações indica que em milho, como em trigo, não há nenhuma evidência de resistência linhagem-específica. Entretanto, como a agressividade da linhagem também depende do ambiente, é aconselhável trabalhar com diversas linhagens puras para diminuir a chance de um nível de agressividade maior por diferenciação e para neutralizar uma possível interação estatística (SNIJDERS & EEUWIJK, 1991).

DUVICK *et alii* (1992) isolaram um pequeno peptídeo dos grãos de milho que inibia a germinação dos esporos e crescimento das hifas do *F. moniliforme* e *F. graminearum*, *in vitro*, o que pode contribuir para a resistência à infecção pelo grão. Vários estudos examinaram a influência da proteína e da fração açúcar-amido na resistência do endosperma. Um aumento na composição de lisina e triptofano do endosperma levou a uma maior susceptibilidade ao *F. moniliforme*, *F. graminearum* e *Diplodia zeae* em comparação com endospermas normais (NICHOLSON *et alii*, 1976; WARREN, 1978), entretanto, não existe necessariamente uma associação entre consistência do grão e a susceptibilidade ao fungo. STYER & CANTLIFFE (1984) sugeriram que um conteúdo maior de açúcar forneceria um substrato ideal para o crescimento patogênico. Entretanto, HEADRICK & PATAKY (1991) não encontraram correlação significativa entre tipo de endosperma, concentração de carboidratos no grão, e infecção pelo *F. moniliforme*.

RHEEDER *et alii* (1990) concluíram que a porcentagem de grãos contaminados e a porcentagem de isolados de *Fusarium* é o melhor método para diferenciação de resistência a *F. moniliforme* e *F. graminearum* entre híbridos. Entretanto, a baixa variação observada para resistência entre os híbridos fez com que estas conclusões tivessem pouco valor.

A expressão da variação genética entre germoplasma de milho doce possibilitou uma seleção a níveis satisfatórios para a resistência ao *F. moniliforme* no Havaí, Estados

Unidos. AL-HEETI (1987) observou correlação altamente significativa entre as respostas dos cultivares de milho à invasão por *F. graminearum*, *F. sporotrichioides*, e *F. poae*. A resistência à podridão do caule por *F. graminearum* também confere resistência ao *Diplodia maydis* (Berk.) e provavelmente a outros organismos causadores da podridão do caule (MOSTAFA *et alii*, 1990). Híbridos resistentes à infecção natural das sementes por espécies de *Fusarium* também mostraram resistência a *D. maydis* (RHEEDER *et alii*, 1990).

RHEEDER *et alii* (1990) verificaram que o *F. moniliforme* inibe o crescimento de outros fungos na espiga, no entanto, infecções simultâneas de *F. poae* e *F. sporotrichioides* com *F. graminearum* podem ocorrer (AL-HEETI, 1987).

Pássaros e insetos espoliadores das espigas são importantes na infecção do milho por *F. graminearum*, e freqüentemente são encontrados esporos de *Fusarium* nestas espécies (WARNER & FRENCH, 1970). A presença de insetos como *Ostrinia nubilalis* e *Glischrochilus quadrisignatus* aumentam a incidência de *F. graminearum* pela predisposição da espiga à infecções (ATTWATER & BUSCH, 1983). Segundo LEW *et alii* (1991) não existe correlação entre insetos e *F. graminearum*. A relação entre insetos e *F. moniliforme* parece mais certa.

Em um experimento realizado por WICKLOW & CALDWELL (1990), foram inoculados ascósporos ou conídias de *G. zeae* em espigas de milho em crescimento dentro de câmaras fechadas à entrada de insetos e pássaros. Os resultados mostraram que não houve infecção. Os autores concluíram que o milho deve primeiro ser danificado por insetos ou pássaros antes do *G. zeae* infectar a planta. Em um outro experimento de campo, suspensões de conídias foram borrifadas na florescência feminina e os resultados mostraram que houve infecção, embora esta infecção tenha sido altamente dependente de chuvas ou irrigação após a inoculação (ULLSTRUP, 1970).

DAVIS *et alii* (1989) não encontraram nenhuma indicação que a infecção por *Fusarium* tem início nos grãos através do sabugo. Entretanto, estudos com microscopia eletrônica de varredura realizados por BACON *et alii* (1992) demonstraram que o *F. moniliforme* está associado com o pedicelo. Infecção da espiga via caule ocorre com

freqüência muito pequena comparada com a infecção por esporos do ar ou inoculação por insetos (OOKA & KOMMEDAHL, 1977).

Em um experimento realizado por WARREN (1978) observou-se que um maior número de infecções ocorreu quando a inoculação com o fungo foi realizada de 4 a 17 dias após a polinização. Vários cultivares mostraram resistência parcial à infecção do milho pelo *F. moniliforme* mas nenhum foi imune. REID *et alii* (1992) documentaram que a melhor diferenciação entre genótipos resistentes e susceptíveis foi obtida quando a inoculação ocorreu dentro da primeira semana após o surgimento da florescência feminina. Após a florescência feminina começar a secar o número de infecções é muito pequeno ou inexistente.

Vários fatores podem evitar a entrada do *Fusarium* através da florescência feminina. Características morfológicas como espigas pendentes e com a palha de cobertura solta no estágio de florescência marron tem menor contaminação do que espigas verticais e com a palha de cobertura mais fechada (ENERSON & HUNTER, 1980). Fatores fisiológicos como grãos que amadurecem mais rápido diminuem o período de susceptibilidade ótima. Em híbridos susceptíveis, a perda de nutrientes em grãos jovens pode estimular a germinação da conídia e o crescimento das hifas do *F. graminearum*. A podridão da espiga por *Fusarium* foi correlacionada positivamente com a população de brocas, que podem agir como vetores de *F. moniliforme*. A exclusão física das brocas de espigas em desenvolvimento, como o ocorrido com as palhas de cobertura fechadas, é um grande fator na redução dos níveis de doença, contrariando os resultados obtidos por ENERSON & HUNTER em 1980 (FARRAR & DAVIS, 1991).

Os maiores danos causados por *Fusarium* no trigo ou no milho geralmente ocorrem em áreas com prática de monocultura contínua ou quando o trigo é plantado após o milho ou vice-versa. Diferentes práticas para minimizar a inoculação inicial, notadamente a rotação com culturas não hospedeiras, a aragem dos resíduos infectados, e insumo baixo de nitrogênio, tem sido recomendadas para o controle do *Fusarium* no trigo e no milho (MARTIN *et alii*, 1991). No entanto, estes são tratamentos que reduzem o problema sem eliminá-lo. A introdução de cultivares resistentes ao *Fusarium* forneceria uma segurança

adicional no controle deste tipo de contaminação. Uma variedade de plantas não hospedeiras incluem sorgo, soja, aveia silvestre, e várias ervas daninhas comuns (FERNANDEZ, 1991). Uma rotação milho-soja aparentemente apresenta menos doenças que uma monocultura de milho (LIPPS & DEEP, 1991). No entanto, alta densidade de ervas daninhas aumenta a presença de *Fusarium* (TEICH & NELSON, 1984).

Numa severa epidemia de podridão das espigas de milhos híbridos ocorrida nas safras de 86-87 em Ontário, Canadá, verificou-se que as temperaturas do mês de julho foram 7% mais quentes e que as chuvas foram 25% maiores que a média dos 30 anos anteriores. Em 1986, houve 100% mais chuva do que o normal nos meses de agosto e setembro, e em 1987, as chuvas foram 38% maiores que o normal (HOUGH, 1991). Epidemias severas portanto, parecem requerer maior quantidade de chuvas e temperaturas acima do normal.

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 opinaram que essas diferenças podem estar sob controle genético. SHELBY *et alii* (1994) trabalharam com 15 híbridos de milho disponíveis comercialmente, os quais foram plantados em 17 locais, em 1990, nos EUA. A média de produção de fumonisinas em todos os híbridos, nos diversos locais, variou de 0,5 a 48,5 µg/g. Foram observados efeitos e interações significativas no que se refere aos fatores locais x híbrido. Baseando-se na produção de fumonisinas por híbridos comerciais, o autor sugeriu a seleção de híbridos resistentes para áreas onde a fumonisina é um problema.

A maioria dos fungos que contaminam as plantas, antes da colheita, é capaz de crescer dentro de limites amplos de pH, pressão osmótica, conteúdo de umidade, bem como, de se desenvolver em temperaturas entre 0 a 30°C. Entretanto, alguns podem crescer a 35°C e outros, próximo a temperatura de congelamento. As espécies de *Fusarium* que geralmente infectam o milho são influenciadas pela geografia, clima e ano (LACEY, 1989).

As fumonisinas, especialmente as B₁ e B₂ são facilmente produzidas quando linhagens toxigênicas de *F. moniliforme* são cultivadas em milho à temperatura de 25°C durante 21 dias. Outras espécies do gênero *Fusarium* também produzem altas concentrações de FB₁ e FB₂, nas mesmas condições (THIEL *et alii*, 1991). ALBERTS *et alii* (1990) estudando a cinética da produção de FB₁ pela linhagem de *F. moniliforme* MRC 826, em várias faixas de temperatura e diferentes tempos de incubação, concluíram que o máximo de crescimento do fungo, ocorria a 25°C, durante 4 a 6 semanas e a produção de toxinas se iniciava na segunda semana, aumentando durante a fase estacionária, caindo após a 13ª semana. ROSS *et alii*, em estudo realizado em 1992, concluíram que as condições de cultivo possuem um papel importante na via biossintética para a produção de fumonisinas.

LE BARS *et alii* (1994) estudando os efeitos dos principais fatores abióticos e bióticos na produção de FB₁, confirmaram que 20°C é a melhor temperatura para produção desta toxina por culturas de *F. moniliforme* em milho. A FB₁ não foi detectada a 5, 35 ou 40°C. A FB₁ não foi também detectada em culturas desenvolvidas em frascos hermeticamente fechados mantidos por 10 semanas, indicando que a FB₁ não deve ser produzida em atmosferas modificadas (silos com atmosferas enriquecidas com N₂ ou CO₂) ou em anaerobiose. A produção máxima de FB₁ foi obtida em culturas com 32% de umidade. Quantidades significativas de FB₁ (> 200 µg/g) foram produzidas no período de 12 dias, em condições de umidade superior a 27.

NELSON *et alii* (1991) estudaram a toxigenicidade de 95 linhagens 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 linhagens provenientes da África, Ásia e América do Norte produziram quantidades significativas de FB₁, mas, outras linhagens, principalmente da África e Austrália, produziram baixos níveis ou não produziram FB₁. LESLIE *et alii* (1992) utilizaram a formação do estágio sexual para distinção das espécies. Em *Gibberella fujikuroi* (Sawada) reconhecem 6 tipos diferentes de populações, designadas pelas letras A 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, os autores concluíram que a quantidade de fumonisina B₁ produzida depende mais do grupo da população a que pertence a linhagem do fungo do que da planta hospedeira ou origem geográfica da linhagem.

CAHAGNIER *et alii* (1995), avaliaram o efeito da atividade de água na biossíntese da fumonisina e no crescimento de *F. moniliforme*. Neste trabalho, os autores verificaram que a maior produção da toxina (3000 µg/g) ocorreu em valores de atividade de água próximos a 1,0. Observaram ainda que, os níveis de fumonisinas diminuíram três vezes quando a atividade de água foi diminuída em 5%, mas o desenvolvimento do fungo não mudou. Uma redução de 10% na atividade de água (de 1,0 para 0,90) resultou em uma diminuição de 20 vezes no crescimento do fungo, e a produção de fumonisina foi reduzida em 300 vezes. No limiar de 0,85–0,86 de atividade de água, o *F. moniliforme* atinge um nível de atividade metabólica não detectável e cessa a produção de fumonisina.

MARIN *et alii* (1995), estudando três linhagens de *F. proliferatum* e uma de *F. moniliforme*, isoladas de grãos de milho provenientes da Espanha, constataram que ocorreu maior produção de fumonisinas B₁ e B₂ em atividade de água 0,956 e 0,968. Demonstraram, ainda, que baixas concentrações das toxinas eram produzidas em atividade de água 0,925.

Cinquenta e um genótipos plantados na Argentina, em 1994, foram analisados por CHULZE *et alii* (1994; 1996), e com exceção de dois híbridos com endosperma do tipo dentado, todos os genótipos testados eram do tipo duro, e o ciclo vegetativo, expresso em termos de dias para atingir a maturidade relativa, variou de 104 a 132. Nenhuma correlação foi encontrada entre ciclo vegetativo e a concentração de fumonisinas, embora uma ligeira tendência negativa tenha sido observada. As concentrações mínima e máxima foram de 0,23 e 37,0 µg/g, respectivamente. A média e a mediana foram 3,04 e 1,65 µg/g, respectivamente. Mais de 60% das amostras continham níveis de fumonisinas maiores que 1,0 µg/g, e 5 amostras tinham mais de 5,0 µg/g, que é o limite máximo recomendado pelo “Mycotoxin Committee of the American Association of Veterinary Diagnostician” para ração de equinos (RILEY *et alii*, 1993). Resultados excepcionais foram encontrados com os

dois híbridos dentados, o primeiro mostrou o maior nível de contaminação (37,0 µg/g) e o segundo teve mais FB₂ (2,99 µg/g) do que FB₁ (1,23 µg/g). A espécie predominante de *Fusarium* da seção Liseola foi medida aos 45, 60, 75, 90, e 105 dias após o florescimento. A incidência de *F. subglutinans* foi maior durante o primeiro estágio (até 60 dias após o florescimento) e depois decresceu, neste período foram encontrados baixos níveis de fumonisinas. *F. moniliforme* aumentou consistentemente até o final da colheita (105 dias após o florescimento), entretanto *F. proliferatum* alcançou um pico de 75 a 90 dias após o florescimento. Concordância foi encontrada entre a ocorrência das espécies produtoras de fumonisinas (*F. proliferatum* e *F. moniliforme*) e a contaminação de fumonisinas nos diferentes estágios de maturidade. Fumonisina B₁ pôde ser detectada 45 dias após o florescimento, entretanto fumonisinas B₂ e B₃ puderam ser detectadas somente após a segunda amostragem (60 dias após o florescimento). Nesta fase, os níveis de FB₁, em média, apresentaram-se acima de 1,0 µg/g. A amostragem dos 75 dias de florescimento mostrou maiores concentrações de fumonisinas (variando de 0,5 a 16,7 µg/g), e incluindo uma subamostragem com uma concentração extremamente alta de FB₂ (11,3 µg/g), até mesmo maior que FB₁ (4,97 µg/g). A proporção de FB₂ para FB₁ maior que 1 é incomum em milho naturalmente contaminado, bem como em culturas de *Fusarium*. Neste estudo este fenômeno aconteceu somente em 2 amostras. Este comportamento foi citado também em outro trabalho (PLATTNER, 1995) que encontrou algumas linhagens atípicas de *Fusarium*, que tem sido isoladas com uma frequência significativa na Argentina, particularmente linhagens de *F. proliferatum*.

Em um estudo abrangendo híbridos de diversas partes do mundo, PLATTNER (1995) analisaram um total de 54 amostras na Croácia, representando 40 híbridos, 14 destes foram plantados em dois anos consecutivos (1992 e 1993). A maioria dos híbridos tinha endosperma do tipo dentado. Dos 19 híbridos testados em 1992, 11 foram positivos para fumonisinas, mas os níveis de contaminação foram menores que 70 ng/g. Os 14 híbridos replantados no ano de 1993 confirmaram os níveis baixos de contaminação ocorridos em 1992 (35% estavam positivos com menos de 0,1 µg/g). Dos outros 21 híbridos testados em 1993, somente 5 amostras (24%) estavam positivas para fumonisinas, com níveis entre 0,1

e 1,0 µg/g. Uma correlação linear entre os níveis de ocorrência natural de fumonisinas e de podridão da espiga causada pela inoculação artificial de *F. moniliforme*, em 14 híbridos plantados em 1993, não pôde ser estabelecida por causa da baixa variação dos dados para ambos os parâmetros. Estes resultados claramente indicam a necessidade de se encontrar híbridos com menor tendência para acumular fumonisinas.

O mesmo pesquisador examinou ainda amostras de milho de 26 variedades obtidas nas safras de 1989 (6), 1990 (19) e 1991 (1) na Itália. Com exceção de duas das variedades com endosperma do tipo semidentado, todas as outras amostras eram do tipo dentado. Todas as amostras testadas estavam contaminadas com níveis de fumonisinas (FB₁+FB₂) que variaram de 0,01 a 2,85 µg/g. Em particular, uma amostra da safra de 1991 e três da safra de 1992 continham mais que 1,0 µg/g de fumonisinas. Os valores da média e da mediana foram 0,45 e 0,07 µg/g, respectivamente. Nenhuma correlação foi encontrada entre ciclo vegetativo e o conteúdo de fumonisinas neste grupo. Em nove amostras provenientes de Portugal, todas foram encontradas contaminadas com FB₁ e FB₂ em níveis que variaram de 0,09 a 4,45 µg/g, e os valores da média e da mediana foram de 1,93 e 1,67 µg/g. A maioria dos híbridos cultivados neste país continham mais de 1,0 µg/g de fumonisinas. Os seis híbridos da Romênia eram de endosperma dos tipos dentado, semiduro ou duro. A metade das amostras mostraram-se positivas às fumonisinas, e os níveis de contaminação foram menores que 0,03 µg/g.

Amostras de 20 híbridos de milho plantados em Zâmbia, África, por três estações consecutivas foram também estudadas. Em 1992, todas as amostras foram contaminadas com fumonisinas em níveis que variaram de 0,02 a 1,71 µg/g, com média e mediana de 0,61 e 0,13 µg/g, respectivamente. Em 1993, os níveis de contaminação dos mesmos híbridos foram consideravelmente maiores, mostrando ainda maior dispersão dos dados. Três amostras estavam livres de fumonisinas, 12 amostras tinham mais que 1,0 µg/g, e uma amostra tinha 13,05 µg/g. A média e a mediana foram 2,4 e 1,63 µg/g, respectivamente. O terceiro ano do experimento (1994) mostrou níveis muito menores de fumonisinas (< 0,2 µg/g) em nove amostras com resultados positivos. Nenhuma correlação foi encontrada entre híbridos e estação, nem entre híbridos e conteúdo de fumonisinas. Considerando todos

os dados obtidos durante os três anos de experimento, a média e a mediana foram 890 e 90 ng/g, respectivamente. Nove das 11 amostras obtidas em Benin, África, estavam positivas para fumonisinas, com apenas uma excedendo a 1,0 µg/g. Os níveis médios das amostras positivas e a mediana foram de 0,7 µg/g e 0,19 µg/g (FB₁+FB₂), respectivamente (PLATTNER, 1995).

Os resultados da análise de sete híbridos da Polônia mostraram apenas duas amostras contaminadas com níveis menores que 0,03 µg/g. As amostras da safra de 1992 eram de endosperma dos tipos duro e semiduro. Três híbridos ricos em lisina se mostraram livres de fumonisinas, o que contraria os resultados apresentados por WARREN (1978) que diz ser este um possível fator de susceptibilidade ao crescimento do *Fusarium*. Os mesmos híbridos, após inoculação artificial com *F. moniliforme* sob condições de campo, mostraram diferentes graus de podridão da espiga com níveis maiores de fumonisinas (de 28 a 261 µg/g) em grãos danificados (CHELKOWSKI *et alii*, 1994).

VISCONTI (1996) coletou dados de pesquisas realizadas sobre a ocorrência natural de fumonisinas B₁ e B₂ em 224 genótipos de milho cultivados em oito países da Europa, África e América do Sul. Alguns híbridos foram testados por dois ou mais anos consecutivos. Dos países considerados na pesquisa, a Argentina teve a maior incidência e os maiores níveis de contaminação por fumonisinas, seguida por Portugal, Zâmbia (safra 1993) e Itália (principalmente safras 1990 e 1991). Baseados nas áreas geográficas e/ou nos níveis de contaminação por fumonisinas, quatro grupos de países podem ser identificados: Europa Oriental (Polônia, Romênia e Croácia), a União Européia (Itália e Portugal), África (Benin e Zâmbia) e América do Sul (Argentina). Somente genótipos de milho cultivados no primeiro grupo de países (Europa Oriental) mostraram pouca ou nenhuma contaminação. Um grau intermediário de contaminação foi encontrado nos países da África, com cerca de 20% das amostras contaminadas com mais de 1,0 µg/g. Em Benin, 82% das amostras foram positivas e em Zâmbia, 100, 70 e 45% foram positivas nas safras de 1992, 1993 e 1994, respectivamente. Nos outros dois grupos de países (União Européia e Argentina), a incidência de amostras positivas para fumonisinas foi 100%, e os níveis de contaminação foram maiores. Em particular os níveis de contaminação na Argentina foram

significativamente maiores ($p < 0,001$) do que os outros países ou grupos de países, no entanto não foi observada nenhuma interação entre híbrido e ciclo vegetativo, nem entre híbrido e características de endosperma.

5. MÉTODOS DE ANÁLISE

Os problemas principais associados com a determinação de micotoxinas são: primeiro, a diversidade nas estruturas químicas das micotoxinas e suas propriedades físico-químicas, onde métodos individuais devem ser desenvolvidos para cada grupo de micotoxinas. Segundo, a detecção e a separação de estruturas homólogas com o grupo das micotoxinas é também uma tarefa difícil. Quantidades traços de toxinas estão presentes numa matriz complexa, como os alimentos, e é necessário a remoção de grandes quantidades de interferentes antes da análise ser feita. Além disso, os tipos de interferentes podem variar consideravelmente nas diferentes amostras, sendo necessários diferentes métodos de limpeza para diferentes alimentos. Finalmente, micotoxinas estão distribuídas de maneira não homogênea nos produtos agrícolas, sendo necessário analisar um grande número de amostras para análise de um produto (CHU, 1984).

Um bom método deve ser específico, sensível e relativamente simples de ser executado (DAVIS *et alii*, 1980). Os métodos analíticos para micotoxinas podem também ser divididos em (a) quantitativos e de triagem, (b) para detectar as micotoxinas individualmente e métodos multi-toxinas, (c) físico-químicos, bioensaios e imunoensaios e ainda, (d) técnicas de confirmação e técnicas cujos resultados são presuntivos (SCOTT, 1991).

Métodos analíticos para detecção e quantificação de fumonisinas são disponíveis, mas são necessários alguns refinamentos para que estes se tornem menos caros, menos demorados, e mais simples. As fumonisinas não tem absorção no ultra-violeta e nem fluorescem, e sua detecção não é direta (GELDERBLOM *et alii*, 1988).

5.1. Extração e limpeza

Segundo RILEY *et alii* (1993) os métodos de extração mais usados para fumonisinas em alimentos envolvem solventes polares como metanol:água (3:1) ou acetonitrila:água (1:1) seguido de limpeza com coluna de troca iônica forte (SAX) ou coluna de fase reversa (C₁₈).

BENNETT & RICHARD (1994) investigaram diferentes proporções de metanol ou acetonitrila com água na extração de culturas de laboratório, rações e milho, e verificaram que a eficiência de extração máxima foi obtida com acetonitrila:água (1:1). SCOTT & LAWRENCE (1994) alertaram para o fato de que FB₁ e FB₂ não são completamente extraídas, em farelo de milho, quando o solvente de extração utilizado é metanol:água (3:1) e concluíram que cada produto deve ser estudado para obtenção de extração máxima.

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

SANCHIS *et alii* (1994) utilizaram uma etapa de desengorduramento com acetato de etila, antes da extração das fumonisinas com metanol:água (3:1).

A recuperação de fumonisinas em amostras artificialmente contaminadas é geralmente > 80%. No entanto, não está definido o quão eficientes são os métodos de extração para todas as fumonisinas, a partir da contaminação direta da matriz (BOTHAST *et alii*, 1992). CAWOOD *et alii* (1991) verificaram que metanol aquoso recupera bem FB₁ (81,3%), concordando com os resultados obtidos por ALBERTS *et alii* (1990). Observaram, porém, que esse sistema de solvente não é bom para a extração de FB₂ (59,8%).

Os procedimentos de limpeza para extratos contendo fumonisinas, em sua maioria, têm utilizado dois tipos de adsorventes na forma de colunas de extração em fase sólida: colunas de troca aniônica forte (SAX) constituídas de aminas quaternárias, como por exemplo, trimetilaminopropil (SYDENHAM *et alii*, 1992b) e colunas de fase reversa C₁₈

(RICE *et alii*, 1995). O uso do método com C₁₈ é relatado como mais rápido que o método com SAX; entretanto, o SAX é considerado como capaz de produzir frações mais limpas e com limite de detecção mais baixo. Colunas cromatográficas abertas de sílica gel 60 (70–230 mesh) também foram empregadas para purificação de extratos metanólicos contendo fumonisinas (SYDENHAM *et alii*, 1990a).

5.2. Cromatografia em camada delgada (CCD)

As fumonisinas podem ser separadas por CCD em placas de fase reversa com sistemas solvente compostos por metanol:água (3:1) ou acetonitrila:água (1:1). Elas podem ser visualizadas quando as placas são pulverizadas com 0,5% de p-anisaldeído e aquecidas a 120°C. A leitura é feita quando aparecem pontos vermelho-púrpura, consequência da reação do p-anisaldeído com o grupo amino da fumonisina. Esse método possui nível de detecção de 10–40 µg/g e encontra uso no caso de triagem de amostras para fumonisinas (GELDERBLOM *et alii*, 1988). Também é empregado em placa de fase normal, de alta eficiência ou não, em culturas de fungos produtores dessas toxinas sob determinado substrato (NELSON *et alii*, 1991). Foi utilizado também para triagem de rações associadas a doenças animais (ROSS *et alii*, 1991a,b) em placas de alta eficiência ou não, de fase normal, utilizando como solvente de desenvolvimento clorofórmio:metanol:ácido acético (6:3:1). O uso de desenvolvimento em duas etapas na mesma direção simplifica o procedimento de extração e permite quantificar o derivado de p-anisaldeído pelo uso de densitometria (LE BARS *et alii*, 1994). O limite de detecção desse método é de 50 µg/g.

Placas de fase reversa têm sido empregadas utilizando revelação com fluorescamina/tampão borato de sódio pH 8–9 (SHELBY *et alii*, 1994). Por esse método os níveis de detecção podem atingir 0,1 µg/g, dependendo da limpeza prévia dos extratos. 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, que é constituída de uma interface sólida de sílica gel empacotada com outros adsorventes (PHILLIPS *et alii*, 1992).

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 de FB₁/g de alimentos a base de milho (PITTET *et alii*, 1992).

A Tabela 2 apresenta os solventes mais usados em cromatografia em camada delgada para determinação de fumonisinas.

TABELA 2. Sistemas solventes para desenvolvimento em camada delgada de sílica gel e C₁₈ para determinação de fumonisinas.

SISTEMA SOLVENTE	REFERÊNCIAS
Metanol: 4% KCl aquoso (3:2)	ROTTINGHAUS <i>et alii</i> . (1992)
Acetato de etila: ácido acético glacial: água (60:30:10)	TSENG <i>et alii</i> . (1995)
Clorofórmio: metanol: água: ácido acético glacial (55:36:8:1)	DUPUY <i>et alii</i> . (1993)
Clorofórmio: metanol: ácido acético glacial (6:3:1)	PLATTNER <i>et alii</i> . (1990 e 1992)
Acetonitrila: água (85:15)	PLATTNER <i>et alii</i> . (1992)
Metanol: água (75:25)	VESONDER <i>et alii</i> . (1990)

5.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Um método de grande popularidade para análise de micotoxinas bem como para outros compostos de baixo peso molecular é a cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE (GREGORY & MANLEY, 1981).

Em geral, o método CLAE combinado com fluorescência e sistemas de detecção ultra-violeta têm mostrado boa sensibilidade e excelente reprodutibilidade. Entretanto, este método apresenta algumas limitações: a) devido a alta sensibilidade, as amostras devem ser submetidas a um extensivo tratamento de limpeza antes da separação pelo CLAE; b) um grande número de amostras não pode ser analisado em pouco tempo; c) manutenção cara

dos instrumentos e solventes e, necessidade de pessoal treinado especialmente para as análises (CHU, 1984).

A primeira abordagem para determinação das fumonisinas por CLAE foi a formação de um derivado maleil que absorve a 250 nm (GELDERBLOM *et alii*, 1988), usado anteriormente por SILER & GILCHRIST (1982) para análise de uma estrutura semelhante, a toxina AAL. Os derivados maleil das fumonisinas eluem de uma coluna C₁₈ de fase reversa com metanol:tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 3,8 (7:3). Este método é satisfatório para análise de milho contaminado naturalmente com *F. moniliforme*, que geralmente produz altos níveis (ppm) de fumonisinas. A sensibilidade na determinação das fumonisinas por CLAE foi acentuada pela formação de derivados fluorescentes com fluorescamina (WILSON *et alii*, 1990) ou com o-ftaldialdeído (SHEPHARD *et alii*, 1990). O limite de detecção, em média, usando estes reagentes de derivação é 50–100 ppb. Estes métodos são também usados para determinação do conteúdo de fumonisinas em milho contaminado naturalmente (NORRED, 1993).

Segundo ROSS *et alii* (1991a) a fluorescamina é um dos vários reagentes empregados para derivação pré-coluna do grupo amino primário das fumonisinas para sua determinação por cromatografia líquida de fase reversa com detecção por fluorescência. Essa derivação tem uma desvantagem, a de originar dois picos (resultando da formação de uma mistura em equilíbrio de ácido/álcool e derivados lactona).

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-ftaldialdeído (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. Os autores aplicaram o método para análise de milho naturalmente contaminado, tanto de rações destinadas a alimentação de equínos como também de culturas de fungos produtores de fumonisinas. Os limites de detecção alcançados são de 0,05 µg/g para FB₁ e 0,1 µg/g para FB₂. O método é reprodutível e pode atingir recuperações de 99,5% e 85,9% para FB₁ 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 com sucesso (SYDENHAM *et alii*, 1996) e esse método de análise de FB₁, FB₂ e FB₃ foi adotado pela AOAC International e pela IUPAC (AOAC, 1996).

O método desenvolvido por SHEPHARD *et alii* (1990) tem sido utilizado por vários pesquisadores com pequenas variações (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 de ser o derivado fumonisina-o-ftaldialdeído instável, 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 têm sido utilizados. Os derivados NDA-naftaleno-2,3-dicarboxaldeído (BENNETT & RICHARD, 1994), NBD-F-4-fluoro-7-nitrobenzofurazona (MILLER *et alii*, 1993) e AccQ.Fluor-6-aminoquinolil N-hidroxi succinimidilcarbamato (VELÁSQUEZ *et alii*, 1995) são mais estáveis que os derivados de OPA. A sensibilidade alcançada com FITC-5-isotiocianato fluoresceína é menor do que a alcançada com derivados NDA (MARAGOS, 1995). O derivado FMOC-9-fluorenilmetil cloroformato (HOLCOMB *et alii*, 1993), por sua vez, 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 de consumo humano. O derivado DBD-F-4-(N,N-dimetil aminosulfonyl)-7-fluor-2,1,3-benzoxadiazole é estável mas requer longo tempo de reação (6 h) 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.

5.4. Cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG/EM)

A confirmação da presença de fumonisinas, bem como sua quantificação, em uma amostra de milho ou alimento pode ser feita pelo uso do método de CG/EM. Neste método, um extrato da amostra é hidrolisado em hidróxido de potássio 1 N a 60°C/1 hora e subsequentemente esterificado com isobutanol, seguido de acetilação com anidrido heptafluorobutírico e detecção em ionização de chama (SYDENHAM *et alii*, 1990a).

Apesar da menor seletividade, o detector de ionização de chama é o mais usado para determinação de fumonisina B₁ em milho. Embora numerosos outros picos possam estar presentes no cromatograma, a resolução da coluna e a sensibilidade do detector são suficientes para quantificar menos que 500 ppb de FB₁ em milho (SYDENHAM *et alii*, 1990a).

Análises mais específicas foram conseguidas pela determinação do aminopiliol, resultante da hidrólise da fumonisina, purificação em XAD-2, e derivação com trimetilsilil (TMS) ou trifluoroacetato (TFA) ou N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA). Os derivados de aminopentol e aminotetraol originados de FB₁ e FB₂, respectivamente, são separados por CG e detectados por ionização de chama ou espectrometria de massas (SYDENHAM *et alii*, 1990a).

O método tem boa sensibilidade e é seletivo, mas requer equipamento relativamente caro (PLATTNER *et alii*, 1990). A vantagem do método CG/EM é que combina confirmação estrutural com quantificação (RILEY *et alii*, 1993).

5.5. Bioensaios e imunoensaios

Os bioensaios são raramente utilizados em alimentos. Tem sido empregados para verificar a toxidez de alimentos ou rações implicados em mortes de animais, para uma identificação inicial de qual seria o substrato contaminado e, neste, qual a fração.

Investigações têm sido realizadas para o desenvolvimento de métodos simples e altamente sensíveis para detecção de micotoxinas. Como consequência, tem sido

desenvolvidas técnicas de imunoensaio, envolvendo a interação de micotoxinas com um anticorpo específico, tais como radioimunoensaio (RIA) e o “enzyme linked immunosorbent assay” (ELISA) (CHU, 1984), que são usados para análise de substâncias biológicas de baixo peso molecular. O RIA e o ELISA são usados para análise de micotoxinas, mas a conjugação de uma micotoxina a uma proteína carreadora é complicada pelos grupos funcionais presentes (WALLACE *et alii*, 1977). Mais recentemente, tem sido desenvolvidas colunas cromatográficas de imunoafinidade para determinação de micotoxinas em alimentos, ração animal e fluidos biológicos como leite e urina (CANDLISH & STIMSON, 1993).

Estas técnicas de imunoafinidade apresentam boa sensibilidade, com níveis de detecção em ppb; são altamente específicas devido a natureza da interação entre anticorpo e antígeno; necessitam pouca preparação da amostra antes dos testes; uma grande variedade de amostras podem ser testadas; é de fácil manipulação; os resultados podem ser obtidos em pouco tempo, geralmente menos de uma hora (CANDLISH & STIMSON, 1993).

O RIA tem a vantagem de ser muito específico e é o método de escolha dos laboratórios clínicos. Entretanto, o RIA tem as desvantagens de requerer reagentes radioativos, equipamentos caros para monitoração da radioatividade e o descarte de resíduos radioativos. Em geral, RIA pode detectar 0,25 a 0,50 ppb para amostras de alimentos e aproximadamente de 2 a 5 ppm para amostras que não sofreram um tratamento de limpeza prévio (UENO & CHU, 1978). Esta técnica não é muito bem aceita para detecção de micotoxinas, embora alguns pesquisadores a usem. Ao contrário, o ELISA é amplamente aceito e usado para determinação de micotoxinas. As principais vantagens desta técnica é a simplicidade, facilidade de uso e capacidade de analisar inúmeras amostras no mesmo dia. A principal desvantagem é que o método é semi-quantitativo e para obter-se resultados quantitativos mais apurados é necessária a construção de curvas dose-resposta (CANDLISH & STIMSON, 1993).

Uma técnica que vem aumentando de popularidade na determinação de micotoxinas é a coluna de extração em fase sólida de imunoafinidade. Este método é simples, robusto e pode ser usado como um método semi-quantitativo para triagem de micotoxinas ou pode

ser acoplado com equipamentos físico-químicos como CLAE para uma quantificação das micotoxinas (CANDLISH & STIMSON, 1993).

Estes ensaios tem sido desenvolvidos para a detecção de diferentes micotoxinas como aflatoxinas, esterigmatocistina, fumonisinas, ocratoxina A, rubratoxina, tricotecenos e zearalenona. A detecção tem sido efetuada com sucesso, em substratos artificial e naturalmente contaminados como milho, milho de pipoca, trigo, café, cevada, sementes de algodão, amendoim, pasta de amendoim, leite, iogurte, queijo, estendendo-se também a material biológico como tecido animal, soro e urina e também ração animal (AZER & COOPER, 1991).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (de acordo com ABNT, 1990)

- ABBAS, H. K., MIROCHA, C. J., KOMMEDAHL, T., BURNES, P. M., MERONUCK, R. A., GUNTHER, R. Toxigenicity of *Fusarium proliferatum* and other *Fusarium* species isolated from corn ears in Minnesota. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, p. 1258-1260. 1988 a.
- ABBAS, H. K., MIROCHA, C. J., MERONUCK, R. A., POKORNY, J. D., GOULD, S. L., KOMMEDAHL, T. Mycotoxins and *Fusarium* species associated with infected ears of corn in Minnesota. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 8, p. 1930-1933, Aug. 1988 b.
- AH SEO, J., WON LEE, Y. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 1331-1334. 1999.
- ALBERTS, J. F., GELDERBLUM, W. C. A., MARASAS, W. F. O. Evaluation of the extraction and purification procedures of the maleyl derivatization HPLC technique for the quantification of the fumonisin B mycotoxins in corn cultures. **Mycotoxin Research**, Mainz, v. 8, p. 2-12, Aug. 1992.
- ALBERTS, J. F., GELDERBLUM, 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, v. 56, n. 6, p. 1729-1733, June. 1990.

- AL-HEETI, A. A., **Pathological, toxicological and biological evaluations of *Fusarium* species associated with ear rot of maize**. Madison, 1987. (Thesis Ph. D. – University of Wisconsin – Madison), 1987.
- ASEVEDO, I. G. **Estudo da microbiota fúngica e influência da temperatura e umidade na produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* Link, 1809 em amostras de milho provenientes de silos**. São Paulo, 1988. (Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, 1988.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. Referências Bibliográficas: NB-66. In: **Normas ABNT sobre documentação**. Rio de Janeiro: ABNT. 1978. p. 13-20. SERIAL sources for the BIOSIS data base. Philadelphia. BIOSIS, 1990.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists**, 16^a ed. Washington: AOAC, 1996.
- ATTWATER, W. A., BUSCH, L. V. Role of the sap beetle *Glischrochilus quadrisignatus* in the epidemiology of *Gibberella* ear rot. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 5, p. 158–163, 1983.
- AZER, M., COOPER, C. Determination of aflatoxins in foods using HPLC and a commercial ELISA system. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 54, n. 4, p. 291–294, Apr. 1991.
- BACON, C. W., BENNETT, R. M., HINTON, D. M., VOSS, K. A. Scanning electron microscopy of *Fusarium moniliforme* within asymptomatic corn kernels and kernels associated with equine leukoencephalomalacia. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, p. 144–148, 1992.
- BACON, C. W., WILLIAMSON, J. W. Interactions of *Fusarium moniliforme*, its metabolites and bacteria with corn. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, n. 1–2, p. 65–71, Feb. 1992.
- 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, v. 77, n. 2, p. 501–506, Mar/Apr. 1994.
- BEZUIDENHOUT, S. C., GELDERBLUM, W. C. A., GORST-ALLMAN, C. P., HORAK, R. M., MARASAS, W. F. O., SPITELLER, G., VLEGGAAR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of Chemical Society, Chemical Communications**, Cambridge, n. 11, p. 743–745, June. 1988.

- 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, 1991. Proceedings...*, n. 36, p. 86–98.
- BOTHAST, R. J. Processing of aflatoxin-contaminated corn. In: SHOTWELL, O. L., HURBURGH Jr, C. R. *Aflatoxin in corn, new perspectives*. Ames: Iowa State University, 1991. p. 369–376.
- 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, 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**, London, v. 12, n. 4, p. 599–607, July/Aug. 1995.
- BUCCI, T., HANSEN, D. K., LABORDE, J. B. Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin fumonisin B₁. **Natural Toxin**, v. 4, p. 51–52, 1996.
- BURGESS, L. W., TRIMBOLI, D. Characterization and distribution of *Fusarium nygamai*, sp. nov. **Mycologia**, Bronx, v. 78, p. 223 – 229, 1986.
- 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, v. 20, n. 4, p. 247–251, July/Aug. 1995.
- CANDLISH, A. A. G., STIMSON, W. H. Emerging techniques: immunoaffinity chromatography. In: BETINA, V. ed. **Chromatography of Mycotoxins**. Amsterdam: Elsevier, 1993. p. 99–123.
- CANELA, R., PUJOL, R., SALA, N., SANCHIS, V. Fate of fumonisins B₁ and B₂ in steeped corn kernels. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 5, p. 511–517, July. 1996.
- CASTRO, M. F. P. M., SOARES, L. M. V., FURLANI, R. P. Z. Mycoflora, aflatoxigenic species and mycotoxins in freshly harvested corn (*Zea mays* L.): a preliminary study. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 26, p. 286–295, 1995.

- CAWOOD, M. E., GELDERBLOM, W. C. A., VLEGGAAR, R., BEHREND, Y., THIEL, P. G., MARASAS, W. F. O. Isolation of the fumonisin mycotoxins: a quantitative approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, n. 11, p. 1958–1962, Nov. 1991.
- CHAMBERLAIN, W. J., NORRED, W. P., BACON, C. W. Isolation and quantitation of fumonisins from corn infected with *Fusarium moniliforme*. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 8, Mexico City. **Abstracts...** 1992. p. 121.
- CHARMLEY, L. L., PRELUSKY, D. B. Decontamination of *Fusarium* mycotoxins. In: MILLER, J. D., TRENHOLM, H. L. eds. **Mycotoxins in Grain – compounds other than aflatoxin**. St. Paul: Eagan Press. 1994. p. 421–435.
- CHATTERJEE, D., MUKHERJEE, S. K. Contamination of indian maize with fumonisin B₁ and its effects on chicken macrophage. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 251–253, May. 1994.
- CHELKOWSKI, J., PRONCZUK, M., VISCONTI, A., DOKO, M. B. Fumonisins B₁ and B₂ accumulation in maize kernels inoculated under field conditions with *Fusarium moniliforme* Sheldon and in naturally infected cobs. **Genetica Polonica**, Varsaw, v. 35 B, p. 333–338. 1994.
- CHRISTENSEN, C. M., SAUER, D. B. Mycoflora. In: CHRISTENSEN, C. M. ed. **Storage of cereal grains and their products**. St. Paul: American Association of Cereal Chemists. 1982. p. 219–240.
- CHU, F. S. Immunoassays for analysis of mycotoxins. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 47, n. 7, p. 562–569, July. 1984.
- CHULZE, S. N., RAMIREZ, M. L., FARNOCHI, M. C., PASCALE, M., VISCONTI, A. *Fusarium* and fumonisins in Argentina. In: INTERNATIONAL MYCOLOGICAL CONGRESS, 5, Vancouver. **Abstract...** 1994. p. 37.
- CHULZE, S. N., RAMIREZ, M. L., FARNOCHI, M. C., PASCALE, M., VISCONTI, A., MARCH, G. *Fusarium* and fumonisin occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 9, p. 2797–2801, Sept. 1996.
- CLEVSTROM, G. **Studies of fungi flora of plants and feeds and the influence of formic acid on growth and aflatoxin production in *Aspergillus flavus***. Upsala, Sweden. 1986. (Dissertation – Department of Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences), 1986.

- CORREA, B., POZZI, C. R., GAMBALE, W., PAULA, C. R., CHACON-RECHE, N. O. Postharvest and stored corn in Brazil. Mycoflora, interaction abiotic factors, and mycotoxins occurrence. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 8, Mexico City. **Abstract...** 1992. p. 123.
- DAVIS, N. D., DICKENS, J. W., FREIE, R. L., HAMILTON, P. B., SHOTWELL, O. L., WYLLIE, T. D. Protocols for surveys, sampling, post-collection handling, and analysis of grain samples involved in mycotoxin problems. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 63, n. 1, p. 95–102, Jan/Feb. 1980.
- DAVIS, R. M., KEGEL, F. R., SILLS, W. M., FARRAR, J. J. *Fusarium* ear rot of corn. **Californian Agriculture**, v. 43, p. 4–5. 1989.
- DE LEON, C., PANDEY, S. Improvement of resistance to ear and stalk rots and agronomic traits in tropical maize gene pools. **Crop Science**, Madison, v. 29, n. 1, p. 12–17, Jan/Feb. 1989.
- DESJARDINS, 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, v. 60, n. 5, p. 1695–1697, May. 1994.
- 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, v. 59, n. 9, p. 2864–2867, Sept. 1993.
- DUVICK, J. P., ROOD, T., RAO, A. G., MARSHAK, D. R. Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 18814–18820, 1992.
- ENERSON, P. M., HUNTER, R. B. A technique for screening maize (*Zea mays* L.) for resistance to ear mold incited by *Gibberella zeae* (Schw.) Petch. **Canadian Journal of Plant Science**, Guelph, v. 60, p. 1123–1128, 1980.
- FANCELLI, A. L. Tecnologia da Produção. In: FANCELLI, L. A., LIMA, V. A. **Milho – produção, pré-processamento e transformação agroindustrial**. São Paulo: Secretaria da Agricultura e Comércio, Ciência e Tecnologia. 1983. p. 1–68. (Série 5).
- FARRAR, J. J., DAVIS, R. M. Relationships among ear morphology, western flower thrips, and *Fusarium* ear rot of corn. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, p. 661–666, 1991.
- 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.

- FERNANDEZ, M. R. Recovery of *Cochliobolus sativus* and *Fusarium graminearum* from living and dead wheat and nongramineous winter crops in southern Brazil. **Canadian Journal of Botanic**, Ottawa, v. 69, p. 1900–1906, 1991.
- FIORENTIM, L. Isolamento, identificação taxonômica e aflatoxigenicidade de fungos do grupo *Aspergillus flavus*, de ingredientes de rações para aves, no Estado de Santa Catarina – Brasil. Pelotas, 1985. (Tese de Mestrado – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, RS), 1985.
- GEDEK, B., HUTTNER, B., KAHLAU, D. I., KOHLER, H., VIELITZ, E. Rachitis bei Mastgeflügel durch Kontamination des Futters mit *Fusarium moniliforme* Sheldon. 1: Mitteilung: Feldbeobachtungen, Reproduktion des Krankheitsbilds und Behandlungsversuche. **Zentralblatt fuer Veterinaermedizin series B**, Berlin, v. 25, p. 29–44, 1978.
- GELDERBLUM, W. C. A., JASKIEWICZ, K., MARASAS, W. F. O., THIEL, P. G., HORAK, R. M., VLEGGAAR, R., KRIEK, N. P. J. Fumonisin: novel mycotoxin with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 7, p. 1806–1811, July. 1988.
- GELDERBLUM, W. C. A., KRIEK, N. P. J., MARASAS, W. F. O., THIEL, P. G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁, in rats. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 12, n. 7, p. 1247–1251, July. 1991.
- GELDERBLUM, W. C. A., MARASAS, W. F. O., VLEGGAAR, R., THIEL, P. G., CAWOOD, M. E. Fumonisin: isolation, chemical characterization and biological effects. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, n. 1–2, p. 11–16, Feb. 1992.
- GELDERBLUM, W. C. A., SNYMAN, S. D., ABEL, S., LEBEPE-MAZUR, S., SMUTS, C. M., Van Der WESTHUIZEN, L., MARASAS, W. F. O., VICTOR, T. C., KNASMÜLLER, S., HUBER, W. In: JACKSON, L., DEVRIES, J. W., BULLERMAN, L. B. eds. **Fumonisin in Food**. New York: Plenum Press. 1996. v. 392.
- GILBERTSON, R. L., BROWN, W. M., RUPPEL, E. G. Prevalence and virulence of *Fusarium spp.* associated with stalk rot of corn in Colorado. **Plant Disease**, St. Paul, v. 69, p. 1065–1068, 1985.
- GONZÁLEZ, H. H. L., RESNIK, S. L., BOCA, R. T., MARASAS, W. F. O. Mycoflora of Argentinian corn harvest in the main production area in 1990. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 130, p. 29–36, 1995.

- GREGORY III, J. F., MANLEY, D. High performance liquid chromatographic determination of aflatoxins in animal tissues and products. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 64, n. 1, p. 144–151, Jan/Feb. 1981.
- HEADRICK, J. M., PATAKY, J. K. Maternal influence on the resistance of sweet corn lines to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, p. 268–274, 1991.
- HIROOKA, E. Y., VIOTTI, N. M. A., MAROCHI, M. A., ISHII, K., UENO, Y. Leucoencefalomalácia em eqüinos no norte do Paraná. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 223–227, jul/set. 1990.
- HIROOKA, E. Y., YAMAGUCHI, M. M., AOYAMA, S., SUGIURA, Y., UENO, Y. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 2, p. 173–183, Feb/Mar. 1996.
- HOLCOMB, M., THOMPSON Jr, H. C., HANKINS, L. J. Analysis of fumonisin B₁ in rodent feed by gradient elution HPLC using precolumn derivatization with FMOC and fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 41, n. 5, p. 764–767, May. 1993.
- HOUGH, K. D. Improved evaluation of *Fusarium graminearum* ear mold tolerance and assessment of differential mycotoxin accumulation in corn (*Zea mays* L.) hybrids. Guelph: University of Guelph, 1991. Thesis, 1991.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Anuário Estatístico do Brasil**, Rio de Janeiro, v. 56, p. 3-54; 3-55, 1996.
- JACKSON, M. A., HLYWKA, J. L., 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, v. 44, n. 3, p. 906–912, Mar. 1996.
- JULIAN, A. M., WARRING, P. W., PHILLIPS, S. I., MEDLOCK, V. F. P., MACDONALD, M. V., DEL RÍO, L. E. Fungal contamination and selected mycotoxins in pre- and post-harvest maize in Honduras. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 129, p. 5–16, 1995.
- KING, S. B., SCOTT, G. E. Genotypic differences in maize to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 71, n. 12, p. 1245–1247, Dec. 1981.

- KRIEK, N. P. J., KELLERMAN, T. S., MARASAS, W. F. O. A comparative study of the *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) to horses, primates, pigs, sheep and rats. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, v. 48, p. 129–131, 1981.
- LACEY, J. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. In: MOSS, M. O., JARUIS, B., SKINNER, F. A. eds. **Filamentous Fungi in Foods and Feeds**. Society Applied Bacteriology Symposium Series, n. 18, (supplement): p. 145, 1989.
- 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, v. 77, n. 2, p. 517–521, Mar/Apr. 1994.
- 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). **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 82, n. 3, p. 341–345, 1992.
- LEW, H., ADLER, A., EDINGER, W. Moniliformin and the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). **Mycotoxin Research**, Mainz, v. 7, p. 71–76, 1991.
- LILLEHOJ, E. B., ZUBER, M. S. Distribution of toxin-producing fungi in nature maize kernels from diverse environments. **Tropical Science**, Oxford, v. 28, p. 19–24, 1988.
- LIPPS, P. E., DEEP, I. W. Influence of tillage and crop rotation on yield, stalk rot and recovery of *Fusarium* and *Trichoderma* spp. from corn. **Plant Disease**, St. Paul, v. 75, p. 828–833, 1991.
- MARAGOS, C. M. Capillary zone electrophoresis and HPLC for the analysis of fluorescein isothiocyanate-labeled fumonisin B₁. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 2, p. 390–394, Feb. 1995.
- 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, v. 77, n. 5, p. 1162–1167, Sept/Oct. 1994.
- MARASAS, W. F. O., KRIEK, N. P. J., STEYN, M., Van RENSBURG, S. S., Van SCHALKWYK, D.J. Mycotoxycological investigations on Zambian maize. **Food and Cosmetics Toxicology**, Elmsford, v. 16, p. 39–45, 1978.
- MARASAS, W. F. O., KRIEK, N. P. S., WIGGINS, V. M., STEYN, P. S., TOWERS, D. K., HASTITE, T. J. Incidence, geographic distribution, and toxigenicity of *Fusarium* species South African corn. **Phytopathology**, St. Paul, v. 69, n. 11, p. 1181–1185, Nov. 1979.

- MARASAS, W. F. O., SHEPHARD, G. S., SYDENHAM, E. W., THIEL, P. G. World-wide contamination of maize with fumonisins: Foodborne carcinogens produced by *Fusarium moniliforme*. In: TAYLOR, J. R. N., RANDALL, P. D., VILJOEN, J. H. eds. **Cereal Science and Technology: Impact on a Changing Africa**. Pretoria: CSIR. 1993. p. 791-805.
- MARASAS, W. F. O., SMALLEY, E. B. Mycoflora, toxicity and nutritive value of mouldy maize. **Onderstepoort Journal of Veterinary Medicine**, Pretoria, v. 39, p. 1-10, 1972.
- MARÍN, S., SANCHIS, V., VIÑAS, I., CANELA, R., MAGAN, N. Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B₁ and B₂ production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize grain. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 298-301. Sept/Oct. 1995.
- MARTIN, R. A., MACLEOD, J. A., CALDWELL, C. Influences of production inputs on incidence of infection by *Fusarium* species on cereal seed. **Plant Disease**, St. Paul, v. 75, p. 784-788, 1991.
- MEIRELES, M. C. A., CORRÊA, B., FISCHMAN, O., GAMBALE, W., PAULA, C. R., CHACON-RECHE, N. O., POZZI, C. R. Mycoflora of the toxic feeds associated with equine leukoencephalomalacia (ELEM) outbreaks in Brazil. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 127, p. 183-188, 1994.
- MEIRELES, M. C. A., CORRÊA, B., FISCHMAN, O., GAMBALE, W., PAULA, C. R., FONSECA, H. Leucoencefalomácia equina (LEME) no Brasil. II. Aspectos microbiológicos e micotóxicos dos surtos ocorridos nos anos de 1988 a 1990. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 7, São Paulo, 1992. **Resumo...** p. 18.
- MERRILL Jr, A. H. Cell regulation by sphingosine and more complex sphingolipids. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, New York, v. 23, n. 1, p. 83-104, Feb. 1991.
- MILLER, J. D. Epidemiology of *Fusarium* ear diseases of cereals. In: MILLER, J. D., TRENHOLM, H. L. eds. **Mycotoxins in Grains - compounds other than aflatoxin**. St Paul: Eagan Press, 1994. p. 19-36.
- MILLER, J. D., SAVARD, M. E., SÍBILIA, A., RAPIOR, S. Production of fumonisins and fusarins by *Fusarium moniliforme* from Southeast Asia. **Mycologia**, Bronx, v. 85, n. 3, p. 385-391, May/June. 1993.
- MILLS, J. T. Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* species on cereal seeds. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 52, n. 10, p. 737-742, Oct. 1989.

- MORICOCCHI, L., FERREIRA, C. R., VICENTE, J. R., PIVA, L. H. O. Potencial de produção e produtividade da agricultura paulista. **Agricultura**, São Paulo, v. 36, p. 127-148, 1989.
- MOSTAFA, M. A. N., COORS, J. G., DROLSOM, P. N. Correlated changes in grain yield and agronomic traits from selection for resistance to stalk rot in maize caused by *Gibberella zeae* (Schw.) Petch. **Maydica**, v. 35, p. 253-258, 1990.
- 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, v. 41, n. 2, p. 263-266, Feb. 1993.
- MUSSER, S. M., PLATTNER, R. D. Fumonisin composition in culture of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygamai*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, p. 1169-1173, 1997.
- NELSON, P. E. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, n. 1-2, p. 29-36, Feb. 1992.
- 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, v. 57, n. 8, p. 2410-2412, Aug. 1991.
- NELSON, P. E., TOUSSOUN, T.A., MARASAS, W. F. O. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, 1983. 203 p.
- NICHOLSON, R. L., BAUMAN, L. F., WARREN, H. L. Association of *Fusarium moniliforme* with brown midrib maize. **Plant Disease Report**, v. 60, p. 908-910, 1976.
- NOGUEIRA JÚNIOR, S., NOGUEIRA, E. A., TSUNECHIRO, A. Consideração sobre a agroindústria do milho. São Paulo: Instituto Econômico de Agricultura, v. 27, p. 1-18, 1987. (Relatório de Pesquisa).
- NORRED, W. P. Fumonisin - Mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, New York, v. 38, n. 3, p. 309-328, 1993.
- 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**, Elmsford, v. 29, n. 12, p. 815-819, Dec. 1991.

- NORRED, W. P., WANG, E., YOO, H., RILEY, R. T., MERRIL Jr, A. H. toxicology of fumonisins and mechanistic implications. *Mycopathologia*, Dordrecht, v. 117, n. 1-2, p. 73-78, Feb. 1992.
- OOKA, J. J., KOMMEDAHL, T. Kernels infected with *Fusarium moniliforme* in corn cultivars with opaque-2 endosperm or male-sterile cytoplasm. *Plant Disease Report*, v. 61, p. 162-165, 1977.
- ORSI, R. B. *Microbiota fúngica em 3 híbridos de milho recém-colhido e armazenado*. São Paulo, 1995. (Tese de Mestrado – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo), 1995.
- 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 and Diagnostic Investigation*, Columbia, v. 4, p. 53-59, 1992.
- PASTER, N., BULLERMAN, L. B. Mould spoilage and mycotoxins formation in grains as controlled by physical means. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 7, n. 3, p. 257-265, July/Sept. 1988.
- PATTERSON, R., YOUNG, L.G. Diluting mouldy corn still best bet. In: *The Market Place*. 1991. p. 36-39.
- PEDROSA, A. V. B., DEZEN, R. B. O milho: características do mercado e perspectivas. *Preços Agrícolas*, v. 55, p. 1-4, 1991.
- PHILLIPS, T. D., CLEMENT, B. A., SARR, A. B., HUANG, Z., WILLIAMS, S. M. Chemiselective immobilization and detection of fumonisin B₁. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 8, Mexico City, 1992. Abstracts... 1992. p. 42.
- PITTET, A., PARISOD, V., SCHELLENBERG, M. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn-based products from the Swiss market. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 40, n. 8, p. 1352-1354, Aug. 1992.
- PLATTNER, R. D. Detection of fumonisins produced in *Fusarium moniliforme* cultures by HPLC with electrospray MS and evaporative light scattering detectors. *Natural Toxins*, v. 3, p. 294-298, 1995.
- 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, v. 82, n. 6, p. 698-702, Mar/Apr. 1990.

- PLATTNER, R. D., WEISLEDER, D., SHACKELFORD, D. D., PETERSON, R., POWELL, R. G. A new fumonisin from solid cultures of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia*, Dordrecht, v. 117, n. 1-2, p. 23-28, Feb. 1992.
- POMERANZ, Y. Biochemical, functional and nutritive changes during storage. In: CHRISTENSEN, C. M. ed. **Storage of cereal grains and their products**. 3^a ed. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1982. p. 145-217.
- POZZI, C. R., CORRÊA, B., GAMBALE, W., PAULA, C. R., CHACON-RECHE, N. O., MEIRELES, M. C. A. Post-harvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxins occurrence. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 12, n. 3, p. 313-319, May/June. 1995.
- PURCHIO, A., GAMBALE, W., PAULA, C. R., BARBIERI, W., SABINO, M., MEIRELES, M. C. A., IIDA, S. Micotoxinas (aflatoxinas, patulina, ochratoxina A e esterigmatocistina) e correspondentes fungos micotoxigênicos em rações destinadas ao gado leiteiro. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 19, p. 172-176, 1988.
- 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 growth in Argentina. *Mycopathologia*, Dordrecht, v. 135, p. 29-34, 1996.
- REID, L. M., BOLTON, A. T., HAMILTON, R. I., WOLDEMARIAM, T., MATHER, D. E. Effect of silkage on resistance of maize to *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 14, p. 293-298, 1992.
- RHEEDER, J. P., MARASAS, W. F. O., Van WYK, P. S., Van SCHALKWYK, D. J. Reaction of South African maize cultivars to ear inoculation with *Fusarium moniliforme*, *F. graminearum* and *Diplodia maydis*. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 22, p. 213-218. 1990.
- 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, v. 78, n. 4, p. 1002-1009, July/Aug. 1995.
- RILEY, R. T., NORRED, W. P., BACON, C. W. Fungal toxins in foods: recent concerns. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 13, p. 167-189, 1993.

- ROSS, P. F., RICE, L. G., OSWEILER, G. D., NELSON, P. E., RICHARD, J. L., WILSON, T. M., RILEY, R. T. A review and update of animal toxicoses associated with fumonisin-contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, n. 1-2, p. 109-114, Feb. 1992.
- ROSS, P. F., RICE, L. G., PLATTNER, R. D., OSWEILER, G. D., WILSON, T. M., OWENS, D. L., NELSON, H. A., RICHARD, J. L. Concentrations of fumonisin B₁ in feeds associated with animal health problems. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 114, n. 3, p. 129-135, June. 1991 a.
- 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 cases. **Journal of Veterinary and Diagnostical Investigation**, Columbia, v. 3, p. 238-241, 1991 b.
- 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 and Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 4, n. 3, p. 326-329, 1992.
- SALGADO, J. M., CARVALHO, P. C. T. Fungos toxigênicos associados a cereais. I – Levantamento da microbiota do milho, trigo e arroz. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 11, p. 60-63, 1980.
- SAMSON, R. A., VON REENEN-HOEKSTRA, E. S. **Introduction to Food-borne Fungi**. 3^a ed. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1988. 299 p.
- SANCHIS, V., ABADIAS, M., ONCINS, L., SALA, N., VIÑAS, I., CANELA, R. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn-based products from the Spanish Market. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 6, p. 2147-2148, June. 1994.
- SCOTT, G. E., KING, S. B. Site of action of factors for resistance to *Fusarium moniliforme* in maize. **Plant Disease**, St. Paul, v. 68, n. 9, p. 804-806, Sept. 1984.
- SCOTT, P. M. Methods of analysis for mycotoxins – an overview. In: ROSSELL, J. B., PRITCHARD, J. L. R. eds. **Analysis of oilseeds, fats and fatty foods**. London: Elsevier, 1991.
- SCOTT, P. M., LAWRENCE, G. A. Stability and problems in recovery of fumonisins added to corn-based foods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, v. 77, n. 2, p. 541-545, Mar/Apr. 1994.

- SEMENTIUK, G. Microflora. In: ANDERSON, J. A., ALCOCK, A. E. eds. **Storage of cereal grains and their products**. St. Paul: American Association of Cereal Chemists. 1954. v. 2, p. 77-151.
- 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, v. 42, n. 9, p. 2064-2067, Sept. 1994.
- SHEPHARD, G. S., SYDENHAM, E. W., THIEL, P. G., GELDERBLUM, W. C. A. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, New York, v. 13, n. 10, p. 2077-2087, Oct. 1990.
- 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, v. 79, n. 3, p. 671-687, May/June. 1996.
- SHEPHARD, G. S., THIEL, P. G., SYDENHAM, E. W. Determination of fumonisin B₁ in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 574, n. 2, p. 299-304, Feb. 1992.
- 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**, Elmsford, v. 32, n. 6, p. 735-741, 1994 b.
- 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**, Elmsford, v. 32, n. 1, p. 23-29, Jan. 1994 a.
- SILER, D. J., GILCHRIST, D. G. Determination of host-selective phytotoxins from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersica* as their maleyl derivatives by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 238, n. 1, p. 167-173, Apr. 1982.
- SILLIKER, J. H., ELLIOTT, R. P. **Ecologia Microbiana de los Alimentos**. Zaragoza: Editorial Acribia. 1980. v. 1, p. 74-96.
- SMITH, J. E., LEWIS, C. W., ANDERSON, J. G., SOLOMONS, G. L. In: **Mycotoxins in Human Nutrition and Health**. Directorate-General XII, Science, Research and Development, European Commission, Report No EUR 16048 EN, p. 39-48. 1994.

- SNIJDEERS, C. H. A., Van EEUWIJK, F. A. Genotype x strain interactions for resistance to *Fusarium* head blight caused by *Fusarium culmorum*. **Theory Applied Genetic**, v. 81, p. 239–244, 1991.
- STYER, R. C., CANTLIFFE, D. J. Infection of two endosperm mutants of sweet corn by *Fusarium moniliforme* and its effect on seedling vigor. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, p. 189–194, 1984.
- SUNDLOF, S. F., STRICKLAND, C. Zearalenone and zeranol: potential residue problems in livestock. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 28, p. 242–250, 1986.
- SUTTON, J. C. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 4, p. 195–209, 1982.
- SYDENHAM, E. W., GELDERBLUM, W. C. A., THIEL, P. G., MARASAS, W. F. O. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 1, p. 285–290, Jan. 1990 a.
- SYDENHAM, E. W., MARASAS, W. F. O., SHEPHARD, G. S., THIEL, P. G., HIROOKA, E. Y. Fumonisin concentration in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, n. 6, p. 994–997, June. 1992 b.
- 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, v. 75, n. 2, p. 313–318, Mar/Apr. 1992 a.
- SYDENHAM, E. W., SHEPHARD, G. S., THIEL, P. G., MARASAS, W. F. O., RHEEDER, J. P., PERALTA-SANHUEZA, C. E., GONZÁLEZ, H. H. L., RESNIK, S. L. Fumonisins in Argentinian field-trial corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 41, n. 6, p. 891–895, June. 1993.
- SYDENHAM, E. W., SHEPHARD, G. S., THIEL, P. G., MARASAS, W. F. O., STOCKENTRÖM, S. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, n. 11, p. 2014–2018, Nov. 1991.
- SYDENHAM, E. W., SHEPHARD, G. S., THIEL, P. G., STOCKENTRÖM, 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, v. 79, n. 3, p. 688–696, May/June. 1996.

- SYDENHAM, E. W., STOCKENSTRÖM, S., THIEL, P. G., SHEPHARD, G. S., KOCH, K. R., MARASAS, W. F. O. Potential of alkaline hydrolysis for the removal of fumonisins from contaminated corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 5, p. 1198–1201, May. 1995.
- SYDENHAM, E. W., THIEL, P. G., MARASAS, W. F. O., SHEPHARD, G. S., Van SCHALKWYK, D. J., KOCH, K. R. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 10, p. 1900–1903, Oct. 1990 b.
- 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**, London, v. 11, n. 1, p. 25–32, Jan/Feb. 1994.
- TEICH, A. H., NELSON, K. Survey of *Fusarium* head blight and possible effects of cultural practices in wheat fields in Lambton County in 1983. **Canadian Plant Disease Surveillance**, v. 64, p. 11–13, 1984.
- THIEL, P. G., MARASAS, W. F. O., SYDENHAM, E. W., SHEPHARD, G. S., GELDERBLOM, W. C. A., RILEY, R. T., RICHARD, J. L. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, n. 1–2, p. 3–9, Feb. 1992.
- 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, v. 57, n. 4, p. 1089–1093, Apr. 1991.
- THIEL, P. G., SYDENHAM, E. W., SHEPHARD, G. S., Van SCHALKWYK, D. J. Study of the reproducibility characteristics of a liquid chromatographic method for the determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn: IUPAC collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, Arlington, v. 76, n. 2, p. 361–366, Mar/Apr. 1993.
- TSENG, T. C., LEE, K. L., DENG, T. S., LIU, C. Y., HUANG, J. W. Production of fumonisins by *Fusarium* species of Taiwan. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 130, n. 2, p. 117–121, 1995.
- TSUNECHIRO, A., OKAWA, H. Perspectivas da safrinha de milho em 1996. **Informativo Econômico**, v. 26, p. 87–89, 1996.

- UENO, Y., CHU, F. S. Modification of hepatotoxic effect of aflatoxin B₁ in rabbits by immunization. **Experientia**, Therwil, v. 35, p. 85–86, 1978.
- ULLSTRUP, A. J. Methods for inoculating ears with *Gibberella zeae* and *Diplodia maydis*. **Plant Disease Report**, v. 54, p. 658–662, 1970.
- 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, v. 43, n. 6, p. 1535–1537, June. 1995.
- VESONDER, R. F., PETERSON, R. E., PLATTNER, R., WEISLEDER, D. Fumonisin B₁: isolation from corn culture, and purification by high performance liquid chromatography. **Mycotoxin Research**, Mainz, v. 6, p. 85–88, 1990.
- 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, v. 44, n. 9, p. 2789–2791, Sept. 1996.
- VISCONTI, A. Fumonisins in maize genotypes grown in various geographic areas. In: JACKSON, L. S., DEVRIES, J. W., BULLERMAN, L. B. eds. **Fumonisins in Food**. New York: Plenum Press. 1996. v. 392, p. 193–204.
- 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, v. 77, n. 2, p. 546–550, Mar/Apr. 1994.
- WALLACE, E. M., PATHRE, S. V., MIROCHA CHESTER, J., ROBISON, T. S., FENTON, S. W. Synthesis of radio-labeled T₂ toxin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 25, n. 4, p. 836–838, July/Aug. 1977.
- WANG, E., NORRED, W. P., BACON, C. W., RILEY, R. T., MERRILL Jr, A. H. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 266, n. 22, p. 1486–1490, Aug. 1991.
- WARNER, G. M., FRENCH, D. W. Dissemination of fungi by migratory birds: Survival and recovery of fungi from birds. **Canadian Journal of Botanic**, Ottawa, v. 48, p. 907–910, 1970.
- WARREN, H. L. Comparison of normal and high-lysine inbreds for resistance to kernel rot caused by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 68, p. 1331–1335, 1978.

- WATSON, S. A., RAMSTAD, P. E. **Corn: Chemistry and Technology**. St. Paul: American Association of Cereal Chemists. 1987. 349 p.
- WENTZ, I., SILVEIRA, P. R. S., SOBESTIANSKY, J., SANTOS, C. R. M., REES, U. Fusariotoxicoses e estrogenismo em suínos. **Comunicação Técnica CNPSA/EMBRAPA**, v. 24, p. 1-3, ago. 1981.
- WICKLOW, D. T., CALDWELL, R. W. Noninfection of maize ears inoculated with *Gibberella zeae* ascospores or macroconidia in a controlled environment. **Trans. Mycology Society Japanese**, v. 31, p. 29-4, 1990.
- WILSON, B. J., MARONPOT, R. R. Causative fungus agent of leukoencephalomalacia in equine animals. **Veterinary Record**, London, v. 88, p. 484-486, 1971.
- 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, v. 2, p. 213-216, 1990.
- WYATT, R. D. The relationship of *Fusarium* and other mold produced toxins and a select aluminosilicate. In: **Proceedings Recent Developments in the Study of Mycotoxins**. Rosemont: Kaiser Aluminum and Chemical Corporation. 1987. D1 - D15 p.
- XAVIER, J. G., BRUNNER, C. H. M., SAKAMOTO, M., CORRÊA, B., FERNANDES, W. E., DIAS, J. L. C. Equine leukoencephalomalacia: Report of five cases. **Brazilian Journal of 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 no Estado do Paraná. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 7, São Paulo, 1992. **Resumo...** p. 27.
- 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, v. 114, n. 1, p. 9-15, 1992.
- YOSHIZAWA, T., YAMASHITA, A., CHOKETHAWORN, N. Occurrence of fumonisins and aflatoxins in corn from Thailand. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 2, p. 163-168, Feb/Mar. 1996.

- YOSHIZAWA, T., YAMASHITA, A., LUO, Y. Fumonisin occurrence in corn from high – and low-risk areas for human esophageal cancer in China. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 5, p. 1626–1629, May. 1994.
- YOUNG, J. C., SUBRYAN, L. M., POTTS, D., McLAREN, M. E., GOBRAN, F. H. Reduction in levels of deoxynivalenol in contaminated wheat by chemical and physical treatment. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 34, p. 461–465. 1986.
- ZOLLER, O., SAGER, F., ZIMMERLI, B. [Occurrence of fumonisins in foods]. **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, v. 85, p. 81–99, 1994.

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS B₁ E B₂ EM MILHO

RESUMO

Sistemas de extração e limpeza foram avaliados para determinação de fumonisinas em milho. O método descrito por SYDENHAM *et alii* (1992) apresentou a melhor limpeza. A recuperação encontrada, no entanto, estava abaixo de 50% para fumonisinas B₁ e B₂ (FB₁ e FB₂). O método foi modificado e a extração com metanol/água (3+1) foi mantida, os volumes de solvente no condicionamento e lavagem da coluna de troca aniônica forte foram aumentados para 10 mL e o volume e composição do solvente de eluição alterado para 20 mL metanol/ácido acético (95+5). Após estas modificações a recuperação elevou-se para a faixa de 93 a 96% para FB₁ e 69 a 85% para FB₂. O solvente de eluição por CLAE com detecção por fluorescência foi modificado para acetonitrila/água/ácido acético glacial (50+50+0,5) durante os primeiros 15 minutos com troca para acetonitrila pura até o final da corrida. As condições de derivação das FB₁ e FB₂ com o o-ftaldialdeído (OPA) foram também otimizadas empregando 100 µL de extrato com 200 µL do reagente OPA entre 5–15°C por 60 segundos. As novas condições melhoraram os limites de detecção para 0,02 e 0,04 µg/g para FB₁ e FB₂, respectivamente, e o desvio padrão relativo entre duplicatas para 0,6% para FB₁ e 2,2% para FB₂.

ABSTRACT

Extraction and clean up systems were evaluated for the determination of fumonisins in corn. The best clean up was the one described by SYDENHAM *et alii* (1992). Recovery,

nonetheless, was found to be below 50% for fumonisins B₁ and B₂ (FB₁ and FB₂). The method was modified and methanol/water (3+1) was kept as the extraction solvent, the volumes of the anionic exchange column conditioning and washing solvents were increased to 10 mL and both the volume and the composition of the eluting solvent were altered to 20 mL methanol/acetic acid (95+5). After these modifications were introduced the method recoveries were 95 to 96% for FB₁ and 69 to 72% for FB₂. The elution solvent for the HPLC with fluorescence detection step was also modified to acetonitrile/water/acetic acid (50+50+0,5) during the first 15 minutes followed by pure acetonitrile for the rest of the run. The conditions employed during the derivatization reaction of fumonisins with o-phthalaldehyde (OPA) were also optimized to utilize 100 µL sample extract and 200 µL OPA solution at 5 15°C during 60 seconds. The new conditions improved the detection limits to 0.02 and 0.04 µg/g for FB₁ and FB₂, respectively, and to an average standard deviation between duplicates of 0,6% for FB₁ and 2,2% for FB₂.

UNITERMS: Mycotoxins, fumonisins, corn, high performance liquid chromatography.

INTRODUÇÃO

As fumonisinas são toxinas capazes de causar leucoencefalomalácia equina (LEME)²², edema pulmonar e hidrotórax em suínos¹⁰, câncer hepático em ratos¹² e leucoencefalomalácia e hemorragia cerebral em coelhos⁶. Os altos níveis de fumonisina B₁ em milho utilizado na dieta humana em algumas localidades da África do Sul e no norte da China, tem sido apontado como a possível causa da alta incidência de câncer de esôfago nas populações envolvidas^{9,36,38}.

Esta família de toxinas foi primeiro relatada em 1988^{12,13} por um grupo de pesquisadores da África do Sul. São produzidas por cepas de *Fusarium moniliforme*

Sheldon³⁹, *F. proliferatum* Seção Liseola¹⁷ e *F. nygamai*⁸. O milho tem sido o cereal mais implicado em contaminação por fumonisinas, tanto em frequência como em níveis. Realmente, o *F. moniliforme* e o *F. proliferatum* são invasores frequentes do milho em todo o mundo⁷.

Originalmente, BEZUIDENHOUT *et alii*⁵ descreveram e caracterizaram quimicamente quatro metabólitos, as fumonisinas A₁ (FA₁), A₂ (FA₂), B₁ (FB₁) e B₂ (FB₂). A chamada série "A" contém amidas acetiladas no C-2, enquanto a série "B" apresenta uma amina primária livre. Mais recentemente duas outras fumonisinas, B₃ (FB₃) e B₄ (FB₄), foram isoladas a partir de cultivos de *F. moniliforme* MRC 826¹⁹. A FB₁ é a mais importante do grupo, constituindo frequentemente até 70% do total das fumonisinas, produzidas tanto em meios de cultura, quanto em milho naturalmente contaminado.

O milho é o cereal mais produzido no Brasil¹⁵ e o nosso país constitui-se no seu terceiro produtor mundial. Apesar disto a produção nacional não satisfaz as necessidades internas. Algumas espécies de *Fusarium* já foram isoladas de milho, trigo, arroz e rações, procedentes de vários Estados brasileiros, em proporções variadas, com predominância de *F. moniliforme* e *F. graminearum*²⁵. Segundo WENTZ *et alii*⁴⁵, 90% das amostras de milho e de rações, para suínos e aves, por eles examinadas no Estado de Santa Catarina, estavam contaminadas com *Fusarium* spp. ASEVEDO³ trabalhando com 90 amostras de milho procedentes de várias regiões do Brasil, encontrou *Fusarium* spp em 62,2% das amostras. CORREA *et alii*¹¹, verificaram uma frequência de 85,1% de *F. moniliforme* em milho pós-colheita.

Embora as informações sobre a incidência de fumonisinas em milho e produtos à base de milho no Brasil sejam escassas, elas mostram a importância do problema para o nosso país. Em um trabalho realizado por SYDENHAM *et alii*³², foram analisadas 21 amostras de ração associadas a casos de micotoxicoses na região de Londrina, Paraná. Os resultados revelaram que 95,2% continham FB₁ e 85,7% continham FB₂. Já HIROOKA *et alii*¹⁴ investigaram 48 amostras de milho provenientes do Paraná, Mato Grosso do Sul e

Goiás, das safras de 1990-1991. Das amostras analisadas, 97,4% apresentavam-se positivas para FB₁ e 94,8% para FB₂. Um total de 4 amostras excederam a 10 µg/g, valor considerado crítico para o desencadeamento da LEME.

Devido ao amplo potencial de contaminação do milho e derivados com fumonisinas^{18,29,38,41,46}, métodos analíticos que monitorem os níveis de fumonisinas nos produtos agrícolas são de grande interesse. Este fato é reforçado pelas necessidades de fiscalização do cereal e seus produtos originados interna ou externamente. É também possível que as poucas informações sobre a incidência de fumonisinas no Brasil advenha exatamente das dificuldades encontradas no país com a metodologia analítica. Diante deste quadro os objetivos do presente trabalho foram: (1) avaliar um conjunto de técnicas já existentes relatadas na literatura e julgadas promissoras para determinação de fumonisinas B₁ e B₂ em milho; (2) uma vez escolhido o método analítico, proceder à sua otimização e adequação para as condições de trabalho encontradas em laboratórios brasileiros.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras: amostras de milho foram adquiridas em estabelecimentos comerciais de Campinas, São Paulo. As amostras foram trituradas em moinho até passarem por uma peneira de 20 mesh e acondicionadas em sacos plásticos impermeáveis à água. Foram mantidas a -18°C até o momento da análise.

2. Padrões de fumonisinas B₁ e B₂: soluções estoques individuais de fumonisinas B₁ e B₂ (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) foram preparadas pesando-se 1 mg e dissolvendo-os em 10 mL de acetonitrila-água (1+1) segundo VISCONTI *et alii*⁴³, obtendo-se uma concentração de 100 µg/mL. Soluções de trabalho foram preparadas em concentrações de 50 µg/mL de FB₁ e de FB₂, respectivamente. Todas as soluções padrões foram armazenadas em frascos âmbar vedados, a -18°C.

3. Solventes e reagentes: acetonitrila grau cromatográfico, metanol, ácido acético glacial, orto-ftaldialdeído (OPA), 2-mercaptoetanol, tetraborato de sódio, ácido clorídrico, hidróxido de sódio, cloreto de potássio, sulfato de amônio, acetato de chumbo, fosfato de sódio, acetato de sódio. Todos os solventes e reagentes usados para extração e limpeza foram de grau analítico.

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

5. Reagente de derivação: 40 mg de o-ftaldialdeído foram dissolvidos em 1 mL de metanol e diluídos com 5 mL de tampão borato de sódio 0,1 M (3,8 g de tetraborato de sódio foram dissolvidos em 100 mL de água deionizada e corrigido o pH para 10,4 com hidróxido de sódio 0,1 M), foram adicionados 50 μL de 2-mercaptoetanol e misturados. O reagente de derivação foi estocado em frasco âmbar vedado com papel alumínio sob temperatura de 5 a 15°C. Permaneceu estável por uma semana.

6. Equipamentos:

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

Liquídificador: comum, de uso doméstico ou equivalente.

Colunas de extração em fase sólida: cartuchos Bond-Elut LRC SAX, com capacidade de 10 mL contendo 500 mg de trimetilaminopropil (Varian, Harbor City, CA)

90710), cartuchos Sep Pak accell plus QMA (Waters Associates, Milford, MA) e cartuchos Sep Pak C₁₈ (Millipore Corporation, Milford, MA).

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

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

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

Banho ultra-som: Microsonic SX 20 ou equivalente.

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

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

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

7. Otimização da separação cromatográfica das fumonisinas B₁ e B₂: fases móveis com diferentes composições foram avaliadas através da resolução das toxinas, com padrões e posteriormente com amostras artificialmente contaminadas com 2 µg/g de cada toxina (FB₁ e FB₂).

8. Otimização da derivação da fumonisina B₁ com o-ftaldialdeído: a formação do derivado FB₁-OPA foi estudada de duas maneiras: (1) variando-se o tempo e temperatura durante a reação de derivação; (2) verificando-se a relação ótima entre a concentração dos padrões e o volume do reagente de derivação. Foi realizada análise de variância dos dados obtidos.

9. Avaliação de sistemas de extração e limpeza: quatro sistemas de extração e limpeza foram avaliados quanto a sua eficiência usando-se amostras de milho artificialmente contaminadas. Foram avaliados os métodos de SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA ³⁰, PRADO *et alii* ²⁰, ZOLLER *et alii* ⁴⁶ e SYDENHAM *et alii* ³⁵. O primeiro sistema de extração e limpeza foi preconizado para aflatoxinas, zearalenona, ocratoxina A e esterigmatocistina e o segundo para aflatoxinas. Foram escolhidos para avaliação devido a

características de praticabilidade e facilidade de emprego em laboratórios nacionais. A concentração de FB₁ e FB₂ nas amostras enriquecidas de milho foi de 2 µg/g de cada.

10. Avaliação de colunas de extração em fase sólida: as colunas de troca aniônica forte de 500 mg, Sep Pak QMA (Waters Associates, Milford, MA) e SAX (Varian, Harbor City, CA 90710) e a coluna de fase reversa Sep Pak C₁₈ (Millipore Corporation, Milford, MA) foram avaliadas quanto a eficiência de limpeza e quanto a recuperação de FB₁ e FB₂ em amostras de milho artificialmente contaminadas.

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

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Otimização das condições de eluição no cromatógrafo à líquido: dentre as várias fases móveis estudadas para separar os derivados de fumonisinas-OPA das impurezas resultantes da derivação ou de interferentes provenientes do extrato da amostra em cromatógrafo à líquido, a melhor resolução para o pico de FB₁ foi conseguida com acetonitrila/água/ácido acético glacial (50+50+0,5). Com a fase móvel escolhida, o tempo de retenção da FB₁ foi de 10,1 e o da FB₂ de 42,6 minutos. O tempo de retenção excessivamente longo para FB₂ recomenda a utilização de uma coluna mais curta, possivelmente com 15 cm de comprimento. Para obter um tempo de retenção menor para a FB₂, na coluna de 25 cm em uso neste estudo, o sistema solvente foi mudado para acetonitrila pura após 15 minutos da injeção da amostra. Com esta modificação, o tempo de retenção da FB₂ foi reduzido para 26 minutos. Antes da injeção da nova amostra, um tempo para re-equilibrar a coluna de 30 minutos com acetonitrila/água/ácido acético glacial (50+50+0,5), tornou-se necessário. A demora na saída da FB₂ tem sido resolvida em alguns laboratórios com o uso de gradientes^{16,23,46}. A Tabela 3 apresenta as fases móveis avaliadas, algumas citadas na literatura.

TABELA 3. Tempo de retenção em cromatografia líquida de alta eficiência para fumonisina B₁ em diferentes fases móveis.

Fase Móvel	Tempo de Retenção para FB ₁	Referências
Acetonitrila/água/ácido acético glacial (50:50:0,5)	10,13	
Acetonitrila/água/ácido acético glacial (50:50:1)	8,30	STACK & EPPLEY ³¹
Acetonitrila/água/ácido acético glacial (51:49:0,5)	10,50	
Acetonitrila/água/ácido acético glacial (51:49:0,1)	2,90	
Acetonitrila/água/ácido acético glacial (51:49:0,3)	8,72	
Acetonitrila/água/ácido acético glacial (52:48:1)	10,02	
Acetonitrila/água/ácido acético glacial (53:47:1)	8,22	
Acetonitrila/água/ácido acético glacial (54:46:1)	12,71	
Acetonitrila/água/ácido acético glacial (54,5:45,5:1)	6,08	
Acetonitrila/água/ácido acético glacial (55:45:1)	6,30	
Acetonitrila/água/ácido acético glacial (56:44:1)	6,78	
Acetonitrila/água/ácido acético glacial (57:43:1)	8,22	
Acetonitrila/água/ácido acético glacial (60:40:1)	4,88	
Acetonitrila/água/ácido acético glacial (70:30:0,5)	4,39	
Acetonitrila/tampão fosfato 0,05 M pH 3,35 (30:70)	3,18	
Acetonitrila/tampão fosfato 0,1 M pH 3,35 (40:60)	2,87	RICE & ROSS ²¹
Acetonitrila/tampão fosfato 0,1 M pH 3,35 (50:50)	2,11	
Acetonitrila/metanol/tampão fosfato 0,1 M pH 3,35 (35:35:30)	2,92	
Acetonitrila/metanol/tampão fosfato 0,1 M pH 3,35 (30:40:30)	3,12	
Metanol/tampão fosfato 0,1 M pH 3,35 (77:23)	3,40	SYDENHAM <i>et alii</i> ³⁴
Metanol/tampão acetato 0,1 M pH 3,5 (50:50)	4,80	ZOLLER <i>et alii</i> ⁴⁶
Metanol/tampão acetato 0,1 M pH 3,5 (80:20)	2,75	
Metanol/tampão acetato 0,1 M pH 3,5 (65:35)	3,23	
Metanol/água/ácido acético glacial (77:23:1)	7,55	
Tampão acetato 0,1 M pH 3,5/metanol/acetonitrila/água (50:25:20:5)	2,36	

Os cromatogramas das soluções padrão de 50 µg/mL de FB₁ e FB₂ e do extrato de milho naturalmente contaminado estão apresentados nas Figuras 2 e 3.

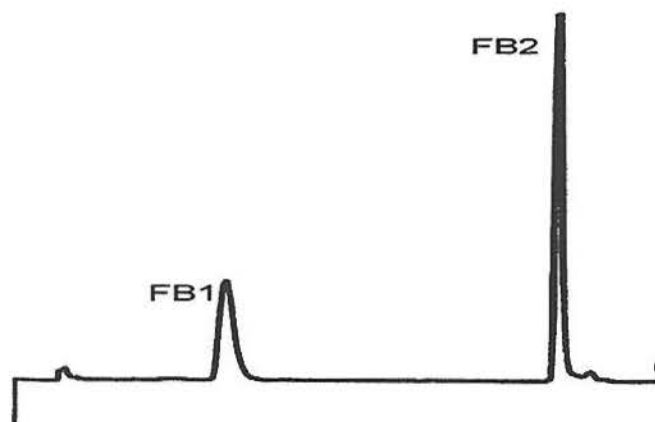


Figura 2. Cromatograma das fumonisinas B₁ e B₂. Condições cromatográficas: coluna (250 mm x 4,6 mm) Varian (Walnut Creek, CA) empacotada com Microsorb-MV 5 µm ODS de fase reversa; fase móvel composta por acetonitrila:água:ácido acético glacial (50+50+0,5) até 15 minutos, seguida por acetonitrila pura; comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 nm e 440 nm; vazão de 1,0 mL/min.

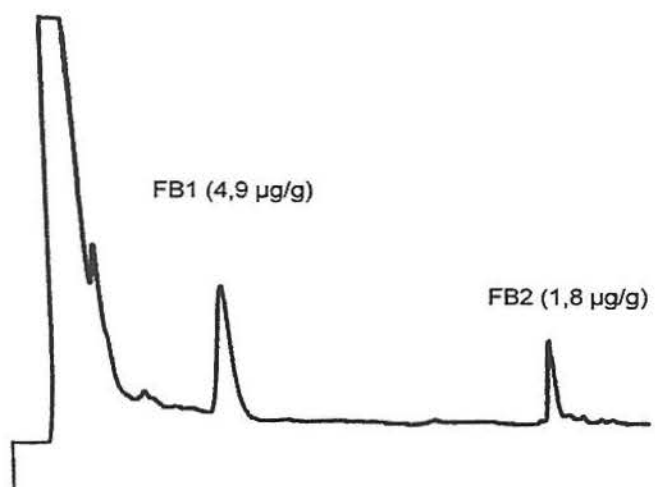


Figura 3. Cromatograma de amostra de milho naturalmente contaminada com FB₁ e FB₂. Condições cromatográficas: coluna (250 mm x 4,6 mm) Varian (Walnut Creek, CA) empacotada com Microsorb-MV 5 µm ODS de fase reversa; fase móvel composta por acetonitrila:água:ácido acético glacial (50+50+0,5) até 15 minutos, seguida por acetonitrila pura; comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 nm e 440 nm; vazão de 1,0 mL/min.

2. Formação do derivado FB₁-OPA: as fumonisinas não apresentam fluorescência e absorvem pobremente no ultravioleta/visível (UV/VIS). Assim sendo uma reação de derivação é necessária para possibilitar a sua determinação por CLAE com detector de fluorescência ou de absorvância no UV/VIS. A reação com marcador fluorescente tem sido favorecida por permitir limites de detecção (LD) mais baixos. Os reagentes propostos até agora tem sido fluorescamina (LD < 10 mg/kg), o-ftaldialdeído (OPA, LD ≈ 50 ng/g), naftaleno-2-3-dicarboxaldeído (NDA, LD ≈ 5 ng/mL, usado em leite), 4-fluoro-7-nitrobenzofurazano (NBD-F, LD ≈ 100 ng/g) e fluorenilmetil cloroformato (FMOC, LD ≈ 200 ng/g)³³. O OPA oferece como vantagens um custo muito inferior aos demais exceto a fluorescamina, ser facilmente disponível e um melhor limite de detecção. A reação com o OPA dá-se com grupos funcionais do tipo amina (Figura 4).

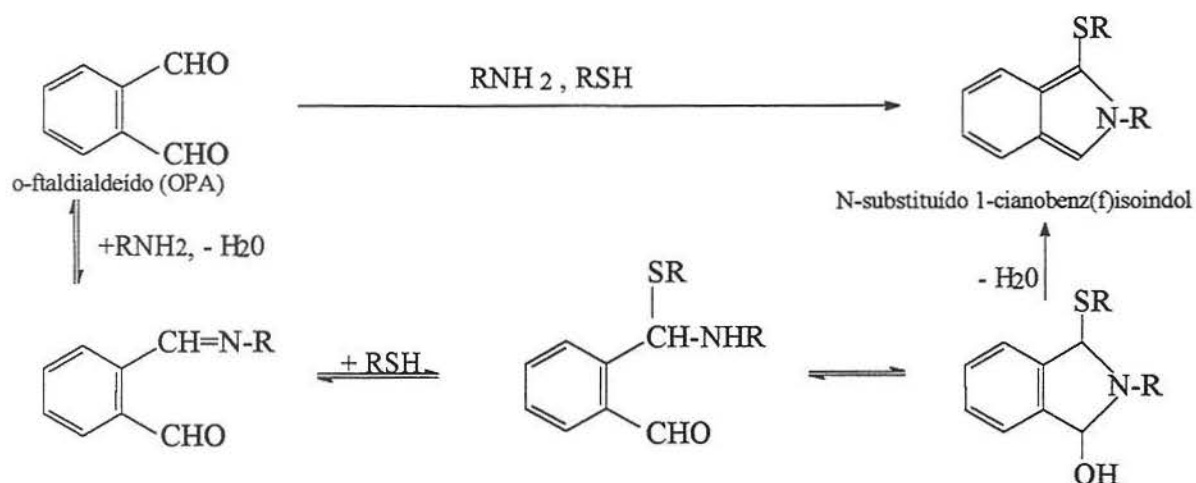


Figura 4. Reação da amina primária da fumonisina com o o-ftaldialdeído (OPA) na presença de 2-mercaptoetanol para formar um derivado N-substituído 1-cianobenz(f)isoindol²⁴.

Como o derivado fumonisina-OPA não é estável, o efeito do tempo de reação na derivação das fumonisinas foi estudado. Para verificar qual seria o melhor tempo de reação,

manteve-se o tempo de agitação inicial em 30 segundos e variou-se o tempo para injeção no cromatógrafo à líquido em 30, 45, 60, 90 e 120 segundos após o início da reação. Os resultados estão representados na Figura 5, a qual indica que o tempo de reação de 60 segundos antes da injeção da amostra apresenta intensidade máxima de fluorescência. No mesmo tempo de reação a repetibilidade dos resultados é melhor (coeficiente de variação – 23,6%). Nos outros tempos de reação analisados houve uma maior variação e um decréscimo na intensidade de fluorescência.

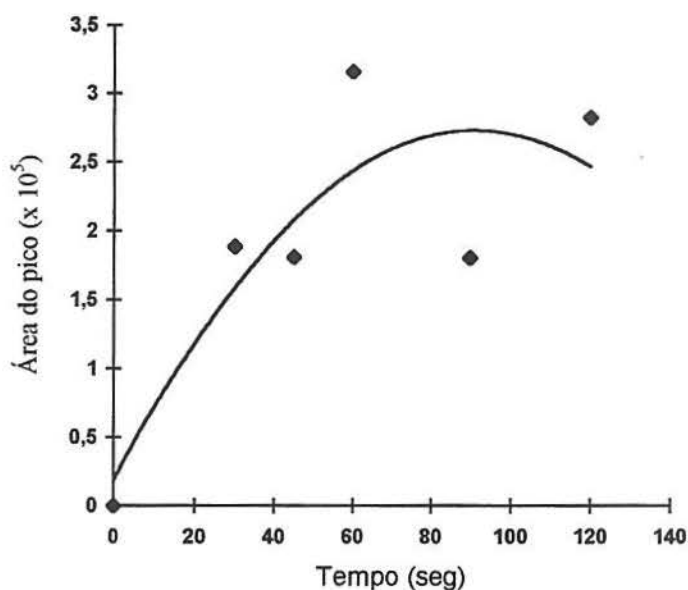


Figura 5. Efeito do tempo de reação na derivação da fumonisina B₁ com OPA, à temperatura ambiente. Cada ponto representa a média de determinações em triplicata.

Visando conseguir um maior rendimento na formação do derivado fumonisinas-OPA, foram estudadas diferentes temperaturas de reação (5 a 30°C). Pode-se observar na Figura 6 que a faixa de temperatura entre 5-15°C dá origem a picos com áreas maiores, possivelmente por melhorar a estabilidade do derivado evitando que se degrade rapidamente,

permitindo assim uma melhor resposta pelo detector de fluorescência. Este resultado contraria os apresentados por THAKUR & SMITH ³⁷ que verificaram não haver diferença significativa na estabilidade da fluorescência do derivado em temperaturas entre 4 a 25°C.

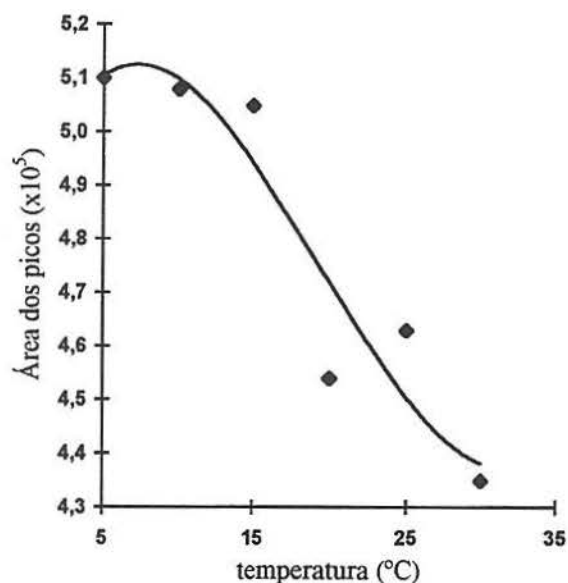


Figura 6. Efeito da temperatura de reação na derivação da fumonisina B₁ com OPA. Cada ponto representa a média de determinações em triplicata.

Para verificar a melhor relação entre a concentração e o volume da solução de fumonisinas, por um lado, e o volume do reagente de derivação OPA, por outro, foi utilizado um esquema fatorial com análise de variância. Foram analisados: concentração do padrão – 25 e 50 µg/mL; volume do padrão – 50, 100, 150 e 200 µL; e volume do reagente de derivação – 150, 200 e 250 µL. Através do esquema fatorial concluiu-se que a condição ótima de trabalho foi obtida quando a concentração do padrão de fumonisinas foi a de 25 µg/mL, o volume do padrão 100 µL e o volume do reagente OPA de 200 µL.

3. Avaliação de sistemas de extração e limpeza: o método preconizado por SOARES & RODRIGUES-AMAYA ³⁰ extrai a amostra por homogeneização em

líquidificador durante 5 minutos com metanol/KCl 4% (9+1). A limpeza do extrato filtrado é conseguida com sulfato de amônio 30%, seguida por duas partições sucessivas para clorofórmio. No método de PRADO *et alii*²⁰, a extração consiste de uma homogeneização em líquidoificador durante 3 minutos com metanol/KCl 4% (9+1). A clarificação do extrato filtrado dá-se com acetato de chumbo 20% e sulfato de amônio 30%, seguida por desengorduramento com isoctano e partição para clorofórmio. No método de ZOLLER *et alii*⁴⁶ a extração é obtida por homogeneização em líquidoificador durante 3 minutos com metanol/HCl 0,1 M (3+1). Por último, a extração segundo SYDENHAM *et alii*³⁵ emprega homogeneização em líquidoificador durante 5 minutos com metanol/água (3+1). Nos dois últimos métodos a limpeza é realizada com colunas de extração em fase sólida de troca aniônica forte. Cabe aqui a observação que o método originalmente descrito por SHEPHARD *et alii*²⁸, foi, com pequenas modificações³⁴, objeto de estudos colaborativos internacionais^{35,40}, tendo sido adotado pela AOAC *International*². Os testes conduzidos no presente trabalho referem-se à forma final do método como foi descrito por SYDENHAM *et alii*³⁴.

Os dois primeiros métodos^{20,30} não produziram uma limpeza adequada, apresentando uma grande quantidade de interferentes no cromatograma. O emprego de sulfato de amônio, em ambos os métodos, dá origem a um precipitado quando o extrato é re-suspendido em acetonitrila/água (1+1), para injeção em cromatógrafo à líquido. O uso de acetato de chumbo no método de PRADO *et alii*²⁰ pode, por sua vez, danificar a coluna analítica pela introdução de um metal pesado no sistema. O desengorduramento com isooctano foi acrescentado para remover os compostos lipossolúveis. A partição para clorofórmio, uma outra etapa do processo de limpeza, mostrou melhor recuperação das fumonisinas quando empregada sozinha e não quando precedida de desengorduramento com isooctano. No entanto, a recuperação das fumonisinas foi inadequada e inferior a 20% em todos estes casos e as etapas de uma maneira geral mostraram-se trabalhosas.

Tanto o método de SYDENHAM *et alii* ³⁵, como o de ZOLLER *et alii* ⁴⁶, apresentaram recuperações inferiores a 50%. A limpeza do método de SYDENHAM *et alii* ³⁵, no entanto mostrou um menor número de interferentes. Por este motivo foi considerado mais promissor e modificações foram introduzidas no sentido de otimizá-lo.

4. Avaliação de colunas de extração em fase sólida: colunas de extração em fase sólida, dos tipos octadecilsilil, troca aniônica forte e imunoafinidade, tem sido empregadas na limpeza de extratos de milho na determinação de fumonisinas ^{26,32}. Os extratos obtidos através do método de SYDENHAM *et alii* ³⁵ foram ainda submetidos a uma etapa de limpeza com colunas de extração em fase sólida. Foram testadas uma coluna de fase reversa tipo octadecilsilil (C₁₈) e duas colunas de troca aniônica forte (SAX).

A limpeza com coluna de fase reversa não foi eficiente, apresentando ainda vários interferentes no cromatograma. No emprego de colunas de C₁₈ para limpeza de extratos de milho, alguns autores recomendam a eluição com metanol/água ou acetonitrila/água ^{4,21}. Outros ainda preconizam a adição de ácido acético ao solvente de eluição ⁴⁴.

Durante a eluição das fumonisinas da coluna de C₁₈, maiores recuperações foram obtidas quando o solvente de extração utilizado foi metanol/água (3+1), mas ainda assim insatisfatórias. Os sistemas solventes utilizados com a coluna de C₁₈, no presente trabalho, estão descritos na Tabela 4.

TABELA 4. Solventes testados com coluna de fase reversa tipo octadecilsilil, para limpeza de extratos de milho na determinação de fumonisinas.

Condicionamento da Coluna	Aplicação da Amostra	Lavagem da Coluna	Eluição das Toxinas
5 mL metanol	10 mL metanol/água (3+1)	6 mL metanol/água + 3 mL metanol	Metanol/água (3+1)
		10 mL metanol/água (3+1)	Metanol/ácido acético (99,5+0,5)

A limpeza com as colunas de troca aniônica forte apresentou melhores resultados do que com as colunas de octadecilsilil, mas ainda assim foi necessário introduzir modificações nos solventes de condicionamento e eluição com relação aos propostos no método de SYDENHAM *et alii* ³⁵. A limpeza com coluna de troca aniônica forte (500 mg) não produziu bons resultados uma vez que retinha 60% de FB₁. Apesar da aparente simplicidade, a separação por troca iônica pode ser complexa. A retenção ou a eluição das fumonisinas pelas colunas de troca aniônica forte utilizadas na etapa de limpeza podem ser afetadas por fatores como pH, força iônica e vazão de eluição ^{34,40}. O pH do extrato deve ser sempre corrigido para 5,8-6,5 segundo todos os autores pois a recuperação das fumonisinas pode ser comprometida em valores de pH abaixo de 5,8 e, por outro lado, as fumonisinas podem ser completamente ionizadas em pH acima de 7, devido aos grupos carboxílicos, presentes na molécula, além deste pH possibilitar a co-extração de compostos interferentes polares.

O condicionamento das colunas foi otimizado alterando-se os seguintes parâmetros: volume das soluções de lavagem, força iônica, volume da solução e vazão de eluição. O aumento da força iônica, ou seja, metanol/ácido acético glacial (99+1) para (95+5) aumentou a recuperação das fumonisinas. Além disso, o uso de solvente com maior força iônica não resultou na co-eluição de compostos intrínsecos do milho que interfeririam com a determinação cromatográfica das fumonisinas. Adicionalmente, com o aumento da quantidade de eluente para 20 mL conseguiu-se recuperações de 72 a 87% de FB₁ e de 51 a 78% de FB₂ em coluna Sep Pak QMA e de 93 a 96% de FB₁ e de 69 a 85% de FB₂ em colunas SAX nas duas primeiras utilizações. Já foi relatado que a recuperação das fumonisinas é substancialmente menor quando a vazão de eluição nas colunas está entre 2,5 a 6,7 mL/minuto, recomendando-se vazões iguais ou menores que 1 mL/min ³⁴. A necessidade de manter estas condições de eluição foram constatadas no presente trabalho.

A limpeza com colunas de C₁₈ é mais rápida, entretanto, as colunas de troca aniônica forte produzem frações mais limpas e o limite de detecção é menor. Numa intercomparação

de métodos realizada entre 31 laboratórios europeus, aqueles que usaram limpeza com colunas de C₁₈ relataram também mais interferentes e limites de detecção piores que aqueles que usaram colunas de troca aniônica forte ⁴².

5. Recuperação, repetibilidade e limites de detecção: a recuperação do método otimizado foi de 93 a 96% para FB₁ e de 69 a 85% para FB₂. No estudo colaborativo do método de SYDENHAM *et alii* ³⁵ conduzido por AOAC-IUPAC, os 12 laboratórios envolvidos obtiveram recuperações de 81 a 84% para FB₁ e 76 a 82% para FB₂. Já os resultados com laboratórios europeus, em estudo em que a metodologia era de livre escolha, as recuperações médias foram 70% para FB₁ e 69% para FB₂ ⁴². Segundo ALBERTS *et alii* ¹ as recuperações mais baixas obtidas para FB₂ podem ser devido a diferença de polaridade em relação a FB₁ que resulta em uma perda de aproximadamente 20% durante a etapa de limpeza, em comparação com os 4% para FB₁. As curvas padrão para FB₁ e FB₂ foram lineares de 0,02 a 10 µg/g e de 0,04 a 10 µg/g, respectivamente, conforme apresentado nas Figuras 7 e 8.

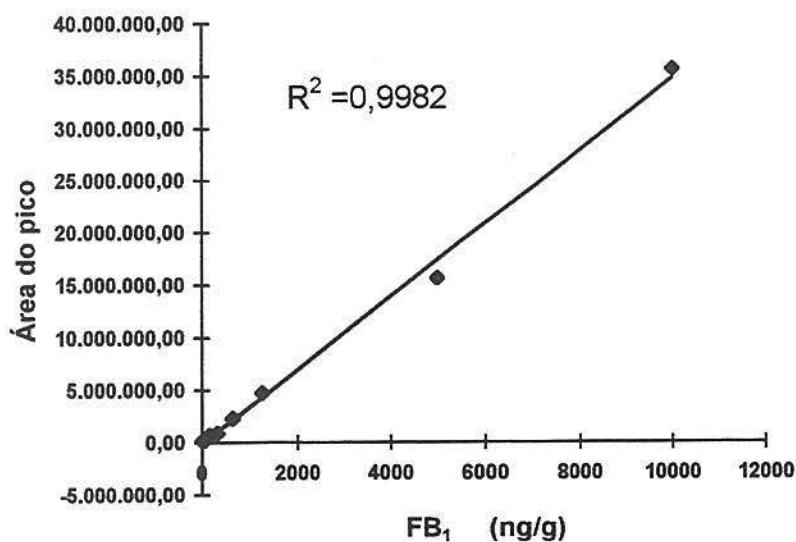


Figura 7. Curva padrão de FB₁ de 0,02 a 10 µg/g.

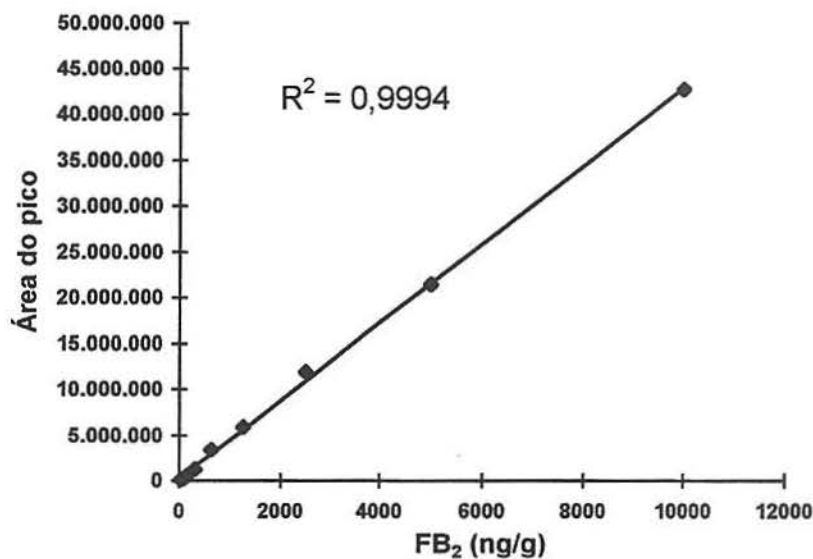


Figura 8. Curva padrão de FB₂ de 0,04 a 10 µg/g.

Os limites de detecção do método foram de 0,02 e 0,04 µg/g para FB₁ e FB₂, respectivamente. SHEPHARD ²⁷ revendo a literatura sobre o assunto dá como usual um limite de detecção da ordem de 50 ng/g para FB₁ e FB₂. A repetibilidade do método mostrou-se adequada com desvios padrão relativos (RSD) de 0,6 % para FB₁ e 2,2% para FB₂ para primeira ou segunda utilização das colunas de SAX. Resultados estes que comparam bem com os encontrados no estudo colaborativo AOAC – IUPAC onde os RSD internos dos laboratórios variaram entre 5,8 a 13,2% para FB₁ e entre 7,2 e 17,5% para FB₂ ³⁵. No estudo europeu ⁴², os valores médios de RSD foram de 10% para FB₁ e 11% para FB₂.

CONCLUSÕES

O método escolhido para determinação de fumonisinas em milho na etapa de avaliação foi o método de SYDENHAM *et alii* ³⁵. Modificações foram necessárias para aumentar a recuperação das toxinas e melhorar o limite de detecção. O método modificado está descrito a seguir:

Cinquenta gramas da amostra foram homogeneizadas em liquidificador com 100 mL de metanol/água (3+1) durante 5 minutos. A mistura foi centrifugada durante 10 minutos a 2000 rpm e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro. O filtrado teve o pH corrigido, quando necessário, para 5,8-6,5 com hidróxido de sódio 1 M (somente 2 a 3 gotas).

A limpeza do extrato filtrado foi conduzida em colunas SAX com 500 mg de recheio. O condicionamento da coluna foi feito através de lavagens com 10 mL de metanol, seguidos de 10 mL de metanol/água (3+1). Foram aplicados 10 mL do extrato filtrado na coluna e lavados com 10 mL de metanol/água (3+1), seguidos por 6 mL de metanol. As fumonisinas foram então eluídas com 20 mL de metanol:ácido acético glacial (95+5). Todos os solventes foram passados pela coluna com uma vazão máxima de 1 mL/min a qual pode ser controlada com vácuo. O eluato foi evaporado a 60°C sob fluxo de nitrogênio. O resíduo concentrado foi lavado com 1 mL de metanol e novamente evaporado para garantir que todo o ácido acético fosse evaporado. O resíduo seco foi mantido em freezer a -18°C até o momento da análise.

Os extratos das amostras de milho foram re-dissolvidos em 500 µL de acetonitrila/água (1+1) e filtrados em filtros com poros de 0,45 µm de diâmetro. Foram transferidos 100 µL deste extrato para um frasco e adicionados 200 µL do reagente OPA. Foi agitado em ultra-som, entre 5-15°C, durante 30 segundos e injetados 20 µL no cromatógrafo após 60 segundos do início da reação.

As fumonisinas foram separadas e quantificadas em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência usando uma fase móvel composta por acetonitrila/água/ácido acético glacial

(50+50+0,5) durante 15 minutos e em seguida por acetonitrila pura. O tempo total de análise foi de 30 minutos. Após a corrida foram necessários 30 minutos para condicionar a coluna com a fase móvel composta por acetonitrila/água/ácido acético glacial (50+50+0,5), antes da próxima injeção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBERTS, J. F.; GELDERBLOM, W. C. A. & MARASAS, W. F. O. Evaluation of the extraction and purification procedures of the maleyl derivatization HPLC technique for the quantification of the fumonisin B mycotoxins in corn cultures. *Mycotoxin Res.*, **8**: 2-12, 1992.
2. AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16ª Edição, 3ª Revisão, Gaithersburg, M.D., 1997.
3. ASEVEDO, I. G. *Estudo da microbiota fúngica e influência da temperatura e umidade na produção de aflatoxinas por Aspergillus flavus Link, 1809 em amostras de milho provenientes de silos*. São Paulo, Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 1988.
4. BENNETT, G. A. & RICHARD, J. L. Liquid chromatographic method for analysis of the naphthalene dicarboxaldehyde derivative of fumonisins. *J. AOAC Int.*, **77**: 501-506, 1994.
5. BEZUIDENHOUT, S. C.; GELDERBLOM, W. C. A.; GORST-ALLMAN, C. P.; HORAK, R. M.; MARASAS, W. F. O.; SPITELLER, G. & VLEGGARR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **11**: 743-745, 1988.
6. BUCCI, T.; HANSEN, D. K. & LABORDE, J. B. Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin Fumonisin B₁. *Nat. Tox.*, **4**: 51-52, 1996.
7. BULLERMAN, L. B. Occurrence of *Fusarium* and fumonisins on food grains and in foods. In: *Fumonisins in Food*, New York, Jackson, L. S.; DeVries, J.W.; Bullerman, L. B. (eds), 1995, p. 27-38.

8. BURGESS, L. W. & TRIMBOLI, D. Characterization and distribution of *Fusarium nygamai*, sp. *Mycologia*, **78**: 223-229, 1986.
9. CHU, F. S. & LI, G. Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidence of esophageal cancer. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 847-852, 1994.
10. COLVIN, B. M. & HARRISON, L. R. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. *Mycopathol.*, **117**: 79-82, 1992.
11. CORREA, B.; POZZI, C. R.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R. & CHACON-RECHE, N. O. Postharvest and stored corn in Brazil. Mycoflora, interaction abiotic factors, and mycotoxins occurrence. *International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*, Mexico City, Livro de Resumos, 1992, p. 123.
12. 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*, **12**: 1247-1251, 1991.
13. GELDERBLOM, W. C. A.; MARASAS, W. F. O.; VLEGGAR, R.; THIEL, P. G. & CAWOOD, M. E. Fumonisin: isolation, chemical, characterization and biological effects. *Mycopathol.*, **117**: 11-16, 1992.
14. HIROOKA, E. Y.; YAMAGUCHI, M. M.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y. & UENO, Y. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. *Food Add. Contam.*, **13**: 173-183, 1996.
15. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Anuário Estatístico do Brasil*, Rio de Janeiro, 1996.
16. MUSSER, S. M. & PLATTNER, R. D. Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium nygami*. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 1169-1173, 1997.
17. NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A. & MARASAS, W. F. O. *Fusarium* species. *An illustrated manual for identification*. State College, Pa., 1983, 203 p.
18. PATEL, S.; HAZEL, C. M.; WINTERTON, A. G. M. & GLEADLE, A. E. Surveillance of fumonisins in UK maize-based foods and other cereals. *Food Add. Contam.* **14**: 187-191, 1997.

19. PLATTNER, R. D.; WEISLEDER, D.; SHACKELFORD, D. D.; PETERSON, R. & POWELL, R. G. A new fumonisin from solid cultures of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathol.*, **117**: 23-28, 1992.
20. PRADO, G.; LEITE, M. P. M. B. & NICÁCIO, M. A. S. Estudo comparativo de métodos analíticos para quantificação de aflatoxinas em ração animal. *Bol. SBCTA*, **27**: 9-13, 1993.
21. RICE, L.G. & ROSS, P.F. Methods for detection and quantitation of fumonisins in corn, cereal products and animal excreta. *J. Food Protec.*, **57**: 516 – 540, 1994.
22. ROSS, P. F.; LEDET, A. E.; OWENS, D. L.; RICE, L. G.; NELSON, H. A.; OSWEILER, G. D. & WILSON, T. M. Experimental equine leukoencephalomalacia, toxic hepatitis, and encephalopathy caused by corn naturally contaminated with fumonisins. *J. Vet. Diag. Investig.*, **5**: 69-74, 1993.
23. ROSS, P. F.; RICE, L. G.; PLATTNER, R. D.; OSWEILER, G. D.; WILSON, T. M.; OWENS, D. L.; NELSON, H. A. & RICHARD, J. L. Concentration of fumonisin B₁ in feeds associated with animal health problems, *Mycopathol.*, **114**: 129-135, 1991.
24. ROTH, M. Fluorescence reaction for amino acids. *Anal. Chem.*, **43**: 880-882, 1971.
25. SALGADO, J. M. & CARVALHO, P. C. T. Fungos toxigênicos associados a cereais. I- Levantamento da microbiota do milho, trigo e arroz. *Rev. Microbiol.*, **11**: 60-63, 1980.
26. SCOTT, P. M. Mycotoxin methodology. *Food Add. Contam.*, **12**: 395-403, 1995.
27. SHEPHARD, G. S. Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins. *J. Chromatogr.* **815**: 31-39, 1998.
28. SHEPHARD, G. S.; SYDENHAM, E. W.; THIEL, P. G. & GELDERBLUM, W. C. A. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Liquid Chrom.*, **13**: 2077-2087, 1990.
29. SHEPHARD, G. S.; THIEL, P. G.; STOCKENSTRÖM, S. & SYDENHAM, E. W. Worldwide survey of fumonisin contaminated of corn and corn-based products. *J. AOAC Int.*, **79**: 671-687, 1996.

30. SOARES, L. M. V. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods, utilizing a multi-toxin thin layer chromatographic method. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**: 22-26, 1989.
31. STACK, M. E. & EPPLEY, R. M. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn products. *J. AOAC Int.*, **75**: 834-837, 1992.
32. 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. *J. Agric. Food Chem.*, **40**: 994-997, 1992.
33. SYDENHAM, E. W. & SHEPHARD, G. S. Chromatographic and allied methods of analysis for selected mycotoxins. London, Gilbert, J. (ed), *Progress in Food Contaminant Analysis*, 1996, p.65-146.
34. SYDENHAM, E. C.; SHEPHARD, G. S. & THIEL, P. G. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂, and B₃ in foods and feeds. *J. AOAC Int.*, **75**: 313-318, 1992.
35. SYDENHAM, E. C.; SHEPHARD, G. S.; THIEL, P. G.; STOCKENSTRÖM, S.; SNIJMAN, P. W. & VAN SCHALKWYK, D. J. Liquid Chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in corn: AOAC-IUPAC collaborative study. *J. AOAC Int.*, **79**: 688-696, 1996.
36. 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. *J. Agric. Food Chem.*, **38**: 1900-1903, 1990.
37. THAKUR, R. A. & SMITH, J. S. Determination of fumonisins B₁ and B₂ and their major hydrolysis products in corn, feed, and meat, using HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, **44**:1047-1052, 1996.
38. THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O. ; SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. S. & GELDERBLUM, W. C. A. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathol.*, **117**: 3-9, 1992.

39. THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O.; SYDENHAM, E. W.; SHEPHARD, G. S.; GELDERBLUM, W. C. A. & NIEUWENHUIS, J. J. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 1089-1093, 1991.
40. THIEL, P. G.; SYDENHAM, E. C.; SHEPHARD, G. S. & Van SCHALKWYK, D. J. Study of the reproducibility characteristics of a Liquid Chromatographic method for the determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn: IUPAC collaborative study. *J. AOAC Int.*, **76**: 361-366, 1993.
41. UENO, Y.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; WANG, D. S.; LEE, U. S.; HIROOKA, E. Y.; HARA, S.; KARKI, T.; CHEN, G. & YU, S. Z. A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. *Mycotoxin Res.*, **9**: 27-34, 1993.
42. VISCONTI, A.; BOENKE, A.; SOLFRIZO, M.; PASCALE, M. & DOKO, M. B. European intercomparison study for the determination of the fumonisins content in two maize materials. *Food Add. Contam.* **13**: 909-927, 1996.
43. VISCONTI, A.; DOKO, M. B.; BOTTALICO, C.; SCHURER, B. & BOENKE, A. Stability of fumonisins (FB₁ and FB₂) in solution. *Food Add. Contam.*, **11**: 427-431, 1994.
44. WARE, G. M.; FRANCIS, O. ; KUAN, S. S.; UMRIGAR, P.; CARMAN, A. & CARTER, L. Determination of fumonisin B₁ in corn by high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Anal. Lett.*, **26**: 1751-1770, 1993.
45. WENTZ, I.; SILVEIRA, P. R. S.; SOBESTIANSKY, J.; SANTOS, C. R. M. & REES, U. Fusariotoxicoses e estrogenismo em suínos. *Comunicação Técnica CNPSA/EMBRAPA*, **24**: 1-3, 1981.
46. ZOLLER, O.; SAGER, F. & ZIMMERLI, B. Vorkommern von fumonisin in Lebensmitteln. *Mitt. Geb. Lebensmitt. Hyg.*, **85**: 81-99, 1994.

**FUMONISINAS EM CULTIVARES DE MILHO NO ESTADO DE SÃO PAULO:
INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS DO CULTIVAR E DAS CONDIÇÕES
CLIMÁTICAS NA SAFRA DE 94/95.**

RESUMO

Cento e cinco amostras de milho recém-colhidos, representando 35 genótipos de milho com diferentes tipos de cultivares, de endosperma e de ciclo vegetativo, foram avaliadas quanto ao teor de fumonisinas e a influência das características e das condições climáticas na sua produção em três Estações Experimentais do Instituto Agrônomo (Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga) em São Paulo, durante a safra de 94/95. Todos os cultivares analisados estavam contaminados com fumonisinas em níveis que variaram de 0,13 µg/g a 6,58 µg/g para FB₁ e de 0,06 µg/g a 2,15 µg/g para FB₂. Mais de 76% das amostras continham níveis de fumonisinas acima de 1,0 µg/g. Não foi observada correlação entre concentração de fumonisinas e tipos de cultivares, de endosperma, ou do ciclo vegetativo. Foi observada uma forte interação entre a contaminação por fumonisinas e o local de cultivo das amostras analisadas. Houve diferença significativa entre as temperaturas mínimas registradas nas Estações Experimentais estudadas durante a safra de 94/95. Não foi observada correlação entre temperatura ambiente e contaminação por fumonisinas. Foi observada correlação negativa ($r = -0,96$) entre índice pluviométrico após o florescimento feminino e concentração de fumonisinas. Embora todos os cultivares analisados apresentassem contaminação por fumonisinas B₁ e B₂, concluiu-se que as condições ambientais específicas de cada área de cultivo representaram um importante fator na formação das fumonisinas no milho.

INTRODUÇÃO

O milho, cereal mais produzido no Brasil (IBGE, 1996), constantemente exposto a contaminação por fungos toxigênicos (WALLER & BRAYFORD, 1990; BACON *et alii*, 1992; ZUMMO & SCOTT, 1992), é cultivado numa área de 13 milhões de hectares, com uma produção anual em torno de 32 milhões de toneladas (TSUNECHIRO & OKAWA, 1996). Os maiores produtores são os Estados do Paraná, Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (IBGE, 1996). No Estado de São Paulo, nos três últimos anos agrícolas, cultivou-se em torno de 1,2 milhão de hectares de milho (DUARTE & PATERNIANI, 1998).

As fumonisinas são um grupo de micotoxinas produzidas principalmente por *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* além de outras espécies da Seção Liseola. O milho é o produto agrícola mais freqüentemente infectado pelo *F. moniliforme*, uma espécie cosmopolita, saprófita, que produz infecções assintomáticas (HEADRICK & PATAKY, 1991). A FB₁ causa leucoencefalomalácia em eqüinos - LEME (ROSS *et alii*, 1991), edema pulmonar e hidrotórax (EPS) em suínos (OSWEILER *et alii*, 1992), hemorragia cerebral em coelhos (BUCCI *et alii*, 1996) e câncer hepático em ratos (GELDERBLOM *et alii*, 1991). A propriedade carcinogênica é atribuída também, a outros componentes do grupo como FB₂ e FB₃ (GELDERBLOM *et alii*, 1992).

Os poucos trabalhos sobre a incidência de fumonisinas em cultivares de milho plantados no Brasil relataram a existência de surtos de LEME nos Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais (MEIRELES *et alii*, 1992), e Paraná (YAMAGUSHI *et alii*, 1992; SYDENHAM *et alii*, 1992). Amostras de milho provenientes do Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás foram investigadas por HIROOKA *et alii* (1996), apresentando-se positivas para FB₁ e FB₂.

Diferenças entre genótipos de milho com relação à infecção pelo *F. moniliforme* parecem estar sob controle genético (KING & SCOTT, 1981). A resistência genética à infecção pelos fungos ou a não susceptibilidade à formação de fumonisinas tem sido estudada (BOLING & GROGAN, 1965; LUNSFORD *et alii*, 1976; SCOTT & KING, 1984), e parece ser uma forma promissora de controle. SHELBY *et alii* (1994) mostraram

produção diferenciada de fumonisinas em 15 híbridos de milho disponíveis comercialmente e plantados em 17 locais nos Estados Unidos. Este estudo sugeriu a possibilidade da seleção de cultivares de milho resistentes e o seu cultivo em áreas onde as fumonisinas são um problema. Estudos com cultivares de milho com vistas a uma possível seleção de genótipos resistentes ao *F. moniliforme* foram realizados também na Europa e na África (RHEEDER *et alii*, 1990 a, b; DOKO *et alii* 1995). Foram encontradas diferenças na ocorrência natural de fumonisinas em vários genótipos estudados, sugerindo a possibilidade de seleção de cultivares mais resistentes.

A cultura do milho encontra condições edafoclimáticas satisfatórias para a exploração agrícola em todo o território nacional. Contudo, as oscilações meteorológicas ao longo do ciclo vegetativo e as variações interanuais podem reduzir drasticamente a produção ou mesmo inibir o desenvolvimento da planta (BRUNINI *et alii*, 1997). O Estado de São Paulo possui em média condições térmicas e hídricas favoráveis para o desenvolvimento da cultura do milho (CAMARGO *et alii*, 1974).

A temperatura constitui-se um dos elementos do clima mais decisivo para o bom desenvolvimento do milho, embora a água e demais componentes climáticos exerçam diretamente sua influência no processo (FANCELLI & DOURADO-NETO, 1997). A recomendação para o plantio do milho vai das regiões compreendidas entre 58° de latitude norte até 40° de latitude sul, passando por diversas altitudes, desde localizadas abaixo do nível do mar, até a região dos Andes. Inclusive, a temperatura é um elemento preponderante na duração do ciclo da cultura, especialmente do subperíodo de desenvolvimento emergência ao florescimento masculino. A duração dos subperíodos após o florescimento é mais homogêneo, embora a perda de umidade dos grãos apresente variação entre os cultivares (GERAGE, 1991). Sendo a planta de milho termosensível, necessita determinada quantidade de calor para completar cada fase de seu ciclo de desenvolvimento.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a produção de fumonisinas B₁ e B₂ em diferentes genótipos de milho recém-colhidos plantados no Estado de São Paulo e a influência das características do cultivar e das condições climáticas com relação a produção de fumonisinas.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras: Cento e cinco amostras de grãos de milho recém-colhidos correspondendo a 35 genótipos, foram coletadas em três Estações Experimentais do Instituto Agronômico (Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga). Os cultivares foram semeados e colhidos respectivamente, em 01/11/1994 e 23/03/1995 em Capão Bonito (143 dias do plantio à colheita); 23/11/1994 e 17/05/1995 em Ribeirão Preto (176 dias do plantio à colheita); e em 24/11/1994 e 25/04/1995 em Votuporanga (153 dias do plantio à colheita). A adubação de plantio e de cobertura foi feita em função da análise química do solo, utilizando a Tabela de Adubação de Milho do IAC (Van RAIJ *et alii*, 1996). Todas as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos impermeáveis a água e armazenadas a -18°C até o momento da análise.

Na Tabela 5 estão relacionados os cultivares que foram avaliados nos testes regionais de 94/95 nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico, compreendendo 32 cultivares comerciais e 3 híbridos experimentais do IAC.

TABELA 5. Relação e características dos cultivares de milho avaliados nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, Estado de São Paulo, na safra de 94/95.

Produtores e/ou Criadores	Genótipos	Tipo de Cultivar ⁽¹⁾	Cor dos Grãos/Tipo de Endosperma	Ciclo ⁽²⁾
Agrocere	AG 122	HD	Amarelo Semidentado	P
Agrocere	AG 510	HTm	Laranja Semiduro	P
Agrocere	AG 1043	HD	Amarelo Semidentado	N
Agrocere	AG 5012	HT	Laranja Semidentado	P
Agromen	AGN 2003	HD	Amarelo Semidentado	N
Agromen	AGN 2012	HD	Amarelo Semidentado	SP
DSMM/CATI	AL 25	V	Amarelo Semidentado	P
DSMM/CATI	AL 34	V	Amarelo Semidentado	N
EMBRAPA	BR 201	HD	Laranja Semidentado	P
EMBRAPA	BR 205	HD	Amarelo Semidentado	P
Cargill	C 701	HD	Laranja Semiduro	P
Cargill	C 805	HT	Amarelo Semiduro	SP
Cargill	C 855	HT	Amarelo Semidentado	SP
Cargill	C 901	HS	Amarelo Semidentado	SP
Colorado	CO 32	HT	Laranja Semiduro	P
Colorado	CO 42	HD	Laranja Semiduro	P
Novartis	Densus	HT	Amarelo Semiduro	SP
Dinamilho-Carol	DINA 556	HSm	Laranja Semidentado	P
Dinamilho-Carol	DINA 766	HSm	Laranja Semiduro	SP
Dinamilho-Carol	DINA 887	HSm	Laranja Semiduro	SP
Novartis	G 550	HT	Laranja Semiduro	N
Novartis	G 600	HD	Amarelo Semidentado	P
IAC	IAC Taiuba	V	Amarelo Semidentado	P
IAC	IAC 3651 E	HS	Laranja Semiduro	P
IAC	IAC 4243 E	HS	Laranja Semiduro	P
IAC	IAC 9643 E	HS	Laranja Semiduro	N
Pioneer	P 3041	HT	Laranja Semiduro	P
Pioneer	P 3051	HT	Laranja Duro	SP
Pioneer	P 3071	HT	Laranja Semiduro	P
Braskalb	XL 370	HT	Amarelo Semidentado	P
Braskalb	XL 380	HT	Amarelo Semidentado	P
Braskalb	XL 660	HD	Amarelo Semidentado	P
Zêneca	ZEN 8392	HS	Laranja Semiduro	SP
Zêneca	ZEN 8452	HS	Laranja Semidentado	P
Zêneca	ZEN 8501	HT	Amarelo Semidentado	N

⁽¹⁾ HD = híbrido duplo; HTm = híbrido triplo modificado; HT = híbrido triplo; V = variedade; HS = híbrido simples; HSm = híbrido simples modificado; HE = híbrido experimental.

⁽²⁾ P = precoce; N = normal; SP = super precoce.

2. Avaliação das características agronômicas: as características dos cultivares foram avaliadas nos laboratórios do Instituto Agronômico de Campinas, cujos resultados se

encontram no Documento Técnico nº 99 da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral – CATI (MEREGE *et alii*, 1996). Os dados diários de temperaturas máximas e mínimas, e as precipitações pluviais foram fornecidos pelo Centro de Ecofisiologia e Biofísica do Instituto Agronômico de Campinas.

3. Padrões de fumonisinas B₁ e B₂: soluções estoques individuais de fumonisinas B₁ e B₂ (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) foram preparadas pesando-se 1 mg e dissolvendo-se em 10 mL de acetonitrila:água (1+1) segundo VISCONTI *et alii* (1994), obtendo-se uma concentração de 100 µg/mL. Soluções de trabalho foram preparadas com concentrações de 50 µg/mL de FB₁ e de FB₂, respectivamente. Todas as soluções padrão foram armazenadas em frascos âmbar vedados, a -18°C.

4. Análise das fumonisinas: para a análise das fumonisinas foi utilizada a metodologia descrita por SHEPHARD *et alii* (1990) com algumas modificações, segundo CAMARGOS *et alii* (1999). As amostras de milho foram trituradas em moinho até atingirem um tamanho de 20 mesh. Cinquenta gramas da amostra foram homogeneizadas em liquidificador com 100 mL de metanol:água (3+1, v/v) durante 5 minutos. A mistura foi centrifugada durante 10 minutos a 2000 rpm e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro. O filtrado teve o pH corrigido, quando necessário, para um pH entre 5,8–6,5 com hidróxido de sódio 1 M (somente 2 a 3 gotas). A limpeza do extrato filtrado foi feita em coluna de extração em fase sólida (SPE) por troca aniônica forte (SAX) após condicionamento da coluna. O condicionamento da coluna foi feito através de lavagens com 10 mL de metanol seguidos por 10 mL de metanol:água (3+1, v/v). Foram aplicados 10 mL do extrato filtrado na coluna e, lavados com 10 mL de metanol:água (3+1, v/v) seguidos por 6 mL de metanol. As fumonisinas B₁ e B₂ foram eluídas com 20 mL de metanol:ácido acético glacial (95+5, v/v). Durante a limpeza o fluxo dos solventes foi controlado a vácuo para que não excedesse a 1 mL/minuto. O eluato foi evaporado a 60°C sob atmosfera de nitrogênio. O resíduo concentrado foi lavado com 1 mL de metanol e novamente evaporado para garantir que todo o ácido acético fosse evaporado. O resíduo seco foi mantido em freezer até o momento da análise. A regeneração das colunas de troca aniônica forte foi realizada com 5 mL de HCl 0,1 M seguidos por 8 mL de água destilada, segundo SYDENHAM *et alii* (1996). As duplicatas foram feitas nas colunas regeneradas.

Para a preparação dos padrões derivados foram transferidos 100 µL das soluções de trabalho das fumonisinas B₁ e B₂ (50+50 µg/mL) para um frasco e adicionados 200 µL do reagente OPA (foram dissolvidos 40 mg de OPA em 1 mL de metanol, diluídos com 5 mL de tampão tetraborato de sódio 0,1 M e adicionados 50 µL de 2-mercaptoetanol), segundo SHEPHARD *et alii* (1990). Foi agitado em ultra-som a 5-15°C durante 30 segundos, e injetados 20 µL após 60 segundos de reação. O reagente OPA foi acondicionado em frasco âmbar, coberto com papel alumínio e conservado por até 1 semana em temperatura de refrigeração.

Os extratos das amostras de milho foram redissolvidos em 500 µL de acetonitrila:água (1+1) e filtrados em filtros de 0,45 µm. Foram transferidos 100 µL deste extrato para um frasco, e adicionados 200 µL do reagente OPA. Foi agitado em ultra-som a 5-15°C durante 30 segundos, e injetados 20 µL após 60 segundos de reação. As fumonisinas foram analisadas por um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, consistindo de uma bomba M-510 (Waters Associates, Milford, MA) com alça de injeção de 20 µL e um injetor tipo Rheodyne Inc M-7125 (Cotati, CA) conectado a um detector de fluorescência HP1046A e um integrador HP3393A (Hewlett Packard, Avondale, PA). As separações foram feitas em coluna (250 mm x 4,6 mm) Varian (Walnut Creek, CA) empacotada com Microsorb-MV 5 µm ODS de fase reversa, usando uma fase móvel composta por acetonitrila:água:ácido acético glacial (50+50+0,5) até 15 minutos, seguida por acetonitrila pura. O tempo total de análise foi de 30 minutos. Após a corrida foram necessários 30 minutos para condicionar a coluna com a fase móvel inicial, antes da próxima injeção. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 nm e 440 nm, respectivamente. A vazão foi de 1,0 mL/minuto.

A identificação dos compostos analisados foi realizada através da comparação dos tempos de retenção estabelecidos com as amostras e os padrões. A quantificação dos compostos foi o da padronização externa, utilizando-se as áreas dos picos. Os limites de detecção do método foram definidos para nossas condições de trabalho, como a concentração das fumonisinas B₁ e B₂ presente na amostra que originou a menor área que permitia visualização inequívoca do pico.

5. Controle de qualidade analítico: as amostras foram analisadas em 3 séries de 10 e uma série de 5, sendo que cada série incluiu um teste de recuperação onde uma amostra

controle, não contaminada naturalmente, foi fortificada ao nível de 2 µg/g para fumonisinas B₁ e B₂. Os teores de fumonisinas encontrados nas amostras analisadas foram corrigidos de acordo com a recuperação encontrada na amostra controle artificialmente contaminada, pertencente a mesma série. Duplicatas de uma mesma amostra foram analisadas em dias diferentes, seguindo o mesmo esquema já descrito. Foram aceitos coeficientes de variação entre duplicatas de até 30%.

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

7. Análise estatística: nas Estações Experimentais o delineamento utilizado no campo foi o de blocos casualizados com três repetições, com 35 tratamentos. As parcelas foram constituídas de quatro linhas de 5,0 m de comprimento, empregando-se as duas centrais para as avaliações. O espaçamento foi de 0,9 m entre linhas e o número de plantas por metro quadrado igual a 5, correspondendo à população de 55.555 plantas por hectare. Foram colhidas todas as espigas das duas linhas centrais, da primeira repetição, e debulhadas. Os grãos foram homogeneizados e uma amostra representativa de 500 g do lote foi retirada para a análise de fumonisinas. A análise de variância dos dados de contaminação com fumonisinas seguiu o esquema de blocos inteiramente casualizados, e, para comparação de médias, utilizou-se o teste de Tukey a 5%, obtidos em microcomputadores utilizando-se o programa de análise estatística – SANEST (ZONTA *et alii*, 1987).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Controle de qualidade analítico: as curvas padrão para FB₁ e FB₂ foram lineares de 0,02 a 10 µg/g e de 0,04 a 10 µg/g, respectivamente. Os limites de detecção do método foram 0,02 µg/g e 0,04 µg/g para FB₁ e FB₂, respectivamente. A recuperação do método modificado variou de 93 a 97% (média de 95%) para FB₁ e de 70 a 85% (média de 78%) para FB₂ (Tabela 6).

TABELA 6. Recuperação de amostras de milho enriquecidas com fumonisinas B₁ e B₂ como controle nas análises das amostras de milho cultivados nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga durante a safra de 94/95.

Colunas empregadas na limpeza do extrato	Recuperação (%)	
	FB ₁	FB ₂
Colunas de troca iônica novas	97	70
	96	70
	94	84
	93	84
Média	95	77
Colunas de troca iônica regeneradas	96	84
	96	70
	94	85
	94	70
	93	84
Média	95	79

A repetibilidade do método mostrou-se adequada com desvios padrão relativos (RSD) de 0,6% para FB₁ e 2,2% para FB₂. Todas as análises foram realizadas em duplicata. O desvio padrão entre duplicatas variou de 0,00 a 2,13 (o desvio padrão médio foi de 0,24). A repetibilidade das análises apresentou desvios padrão relativos (RSD) de 0,00 a 106,15% (o RSD médio foi de 21,81%). A quantificação foi executada comparando-se as áreas dos picos com as áreas dos padrões.

2. Incidência de fumonisinas: a incidência de fumonisinas B₁ e B₂ variou significativamente ($p < 0,001$) entre locais e cultivares, sendo também significativa a interação cultivares x locais ($p < 0,001$). Todos os cultivares analisados continham fumonisina B₁ (FB₁) em níveis que variaram de 0,13 µg/g a 6,58 µg/g (concentração média de 2,34 µg/g) e fumonisina B₂ (FB₂) em níveis que variaram de 0,06 µg/g a 2,15 µg/g (concentração média de 0,59 µg/g). A concentração total de fumonisinas variou de 0,31 µg/g a 8,69 µg/g com valor médio de 2,92 µg/g. A proporção FB₂/FB₁ variou de 0,06 a 0,93, excluindo os valores atípicos de 1,38 e 1,47 encontrados nas amostras dos cultivares XL 370 e G 600 de Votuporanga. As maiores médias de contaminação foram encontradas nas amostras de Capão Bonito, tanto para FB₁ como para FB₂. O cultivar Densus

apresentou os maiores níveis de contaminação em Capão Bonito e Ribeirão Preto, sendo mais sensível à produção de fumonisinas B₁ e B₂, portanto, não se indica o seu plantio nestes locais.

Cerca de 24,0% das amostras continham níveis de fumonisina B₁ até 1,0 µg/g, e 7,6% das amostras estavam contaminadas com níveis superiores a 5,0 µg/g (Figura 9), que é um nível de contaminação preocupante, de acordo com as recomendações dadas pelo "Mycotoxin Committee of American Association of Veterinary Diagnostician" (RILEY *et alii*, 1993). São indicados níveis menores que 5,0 µg/g em ração para equínos, e para ração de suínos, níveis menores que 10,0 µg/g (RILEY *et alii*, 1993). Segundo ROSS *et alii* (1992), uma concentração de FB₁ maior que 10,0 µg/g em ração pode causar leucoencefalomalácia (LEME) em equínos. Entretanto, concentrações menores de FB₁, 7,7 µg/g, foram associados a LEME (THIEL *et alii*, 1991).

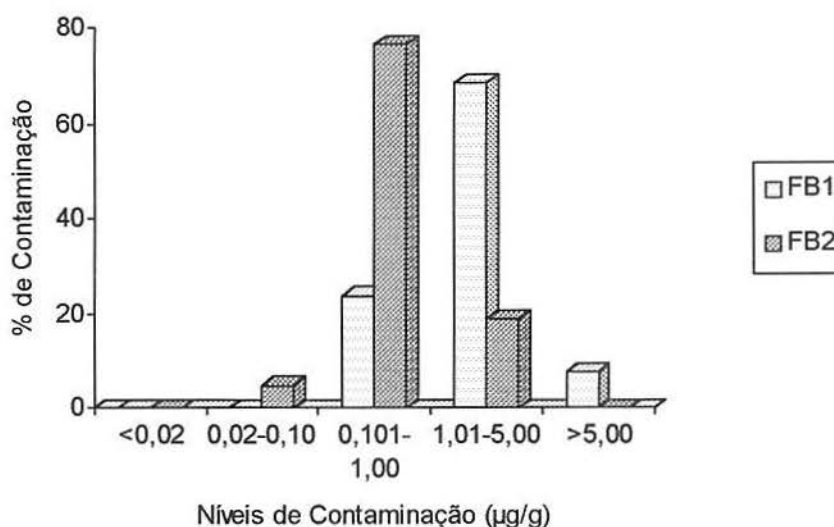


FIGURA 9. Distribuição de freqüência da contaminação por fumonisinas B₁ e B₂ das amostras de 35 cultivares de milho obtidos em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, na safra de 94/95.

Os resultados observados para incidência de fumonisinas no presente trabalho (0,13-6,58 µg/g para FB₁ e de 0,06-2,15 µg/g para FB₂) são maiores que os encontrados no milho

da República da China (0,19-2,96 $\mu\text{g/g}$ para FB_1 e de 0,30-0,55 $\mu\text{g/g}$ para FB_2), segundo YOSHIZAWA *et alii* (1994) onde foi observada uma correlação entre contaminação por fumonisinas e incidência de câncer de esôfago na população humana e, maiores do que os níveis detectados na Espanha por SANCHIS *et alii* (1994), onde a contaminação variou de 0,05 a 0,2 $\mu\text{g/g}$ e também em diferentes genótipos analisados em vários países da Europa e da África (VISCONTI, 1996). No entanto, são menores do que os detectados em genótipos da Argentina (0,18-27,05 $\mu\text{g/g}$ para FB_1 e de 0,04 a 9,96 $\mu\text{g/g}$ para FB_2), segundo RAMIREZ *et alii* (1996), e do que os detectados no Estado do Paraná (0,6 a 12,55 $\mu\text{g/g}$ para FB_1 e 1,2 a 10,24 $\mu\text{g/g}$ para FB_2), segundo HIROOKA *et alii* (1996). Pode-se concluir então, que é necessário uma investigação maior, quanto a contaminação por fumonisinas, nos produtos de milho destinados ao consumo humano no Brasil.

Em Capão Bonito, os cultivares Densus, IAC Taiúba, AG 1043, AGN 2003 e C 805, apresentaram maior incidência de FB_1 com níveis acima de 5,0 $\mu\text{g/g}$. Para FB_2 , os maiores níveis foram observados nos cultivares C 701 e Densus, com valores acima de 2,0 $\mu\text{g/g}$. Em Ribeirão Preto, os cultivares C 805, Densus e G 550, apresentaram valores acima de 5,0 $\mu\text{g/g}$ de FB_1 , enquanto que todos os cultivares apresentaram valores abaixo de 1,0 $\mu\text{g/g}$ para FB_2 . Apesar da média de FB_1 em Votuporanga ter sido a metade da observada em Capão Bonito, os cultivares AG 1043 e C 901 apresentaram valores elevados de contaminação. Para FB_2 , os cultivares AG 1043, AGN 2012, C 805, C901, G 550, P 3051 e ZEN 8392 apresentaram valores acima de 1,0 $\mu\text{g/g}$.

Os resultados da incidência de fumonisinas B_1 e B_2 nos genótipos de milho analisados por local estão apresentados na Tabela 7.

TABELA 7. Incidência de fumonisinas B₁ e B₂ em 35 cultivares de milho plantados nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, na safra de 94/95.

Genótipos	Capão Bonito		Ribeirão Preto		Votuporanga	
	FB ₁ (µg/g)	FB ₂ (µg/g)	FB ₁ (µg/g)	FB ₂ (µg/g)	FB ₁ (µg/g)	FB ₂ (µg/g)
AG 122	3,54	0,83	0,32	0,04	1,00	0,24
AG 510	4,04	1,00	3,67	0,50	1,32	0,46
AG 1043	5,06	1,13	2,10	0,29	4,67	1,15
AG 5012	4,34	1,19	2,05	0,39	1,55	0,50
AGN 2003	6,05	1,59	2,29	0,32	1,11	0,18
AGN 2012	2,21	0,55	3,12	0,64	3,43	1,47
AL 25	4,31	1,20	3,88	0,33	1,04	0,44
AL 34	2,39	0,55	2,27	0,17	2,22	0,62
BR 201	1,68	0,46	2,74	0,29	1,04	0,36
BR 205	0,29	0,11	1,49	0,15	1,37	0,65
C 701	2,64	2,15	4,04	0,49	0,21	0,10
C 805	5,07	1,08	5,77	0,60	2,03	1,04
C 855	0,87	0,29	0,90	0,16	2,79	0,96
C 901	1,92	0,51	1,43	0,15	4,03	1,86
CO 32	1,70	0,53	2,89	0,23	0,66	0,53
CO 42	2,57	0,35	2,76	0,28	0,73	0,06
Densus	6,58	2,11	6,13	0,82	0,98	0,23
DINA 556	4,39	1,89	2,47	0,28	0,89	0,83
DINA 766	2,25	0,72	3,29	0,30	0,74	0,23
DINA 887	4,28	1,47	0,88	0,07	0,54	0,37
G 550	0,80	0,22	5,07	0,48	2,88	1,62
G 600	3,26	1,19	0,33	0,11	0,65	0,96
IAC Taiuba	6,30	1,51	1,37	0,25	1,96	0,34
IAC 3651 E	3,06	1,02	1,55	0,25	1,52	0,44
IAC 4243 E	1,26	0,63	2,34	0,21	0,82	0,31
IAC 9643 E	3,44	0,84	2,46	0,27	2,70	0,75
P 3041	3,04	0,80	1,47	0,17	0,36	0,25
P 3051	2,99	0,90	4,58	0,64	2,66	1,49
P 3071	3,95	0,99	3,25	0,28	0,30	0,17
XL 370	0,78	0,32	2,68	0,36	0,13	0,18
XL 380	1,71	0,32	1,95	0,21	1,03	0,22
XL 660	2,69	0,79	1,94	0,11	0,62	0,28
ZEN 8392	1,68	0,38	2,48	0,36	3,24	1,26
ZEN 8452	1,68	0,13	0,54	0,05	0,69	0,27
ZEN 8501	2,33	0,24	1,97	0,25	0,40	0,36
Média	3,00	0,86	2,53	0,30	1,49	0,60
Desvio Padrão	0,24	0,12	0,41	0,09	0,42	0,14
C. V. (%) *	21,6	28,6	21,6	28,6	21,6	28,6
Dms * (Tukey a 5%)	1,99	0,67	1,99	0,67	1,99	0,67

Os resultados representam a média de duplicatas e foram corrigidos para a recuperação.

Limites de detecção: FB₁ = 0,02 µg/g e FB₂ = 0,04 µg/g.

* Dados obtidos da análise de variância conjunta dos três locais.

3. Influência das características agronômicas na produção de fumonisinas: a análise estatística dos dados mostrou haver uma forte interação entre contaminação por fumonisinas e o local de plantio dos cultivares. Não houve correlação entre contaminação por fumonisinas e tipo de cultivar, no entanto híbridos duplos apresentaram níveis de contaminação abaixo da média nos três locais estudados. As variedades estavam mais contaminadas em Capão Bonito, e os híbridos triplos foram mais contaminados em Ribeirão Preto, não havendo diferença significativa entre os tipos de cultivares em Votuporanga (Figura 10).

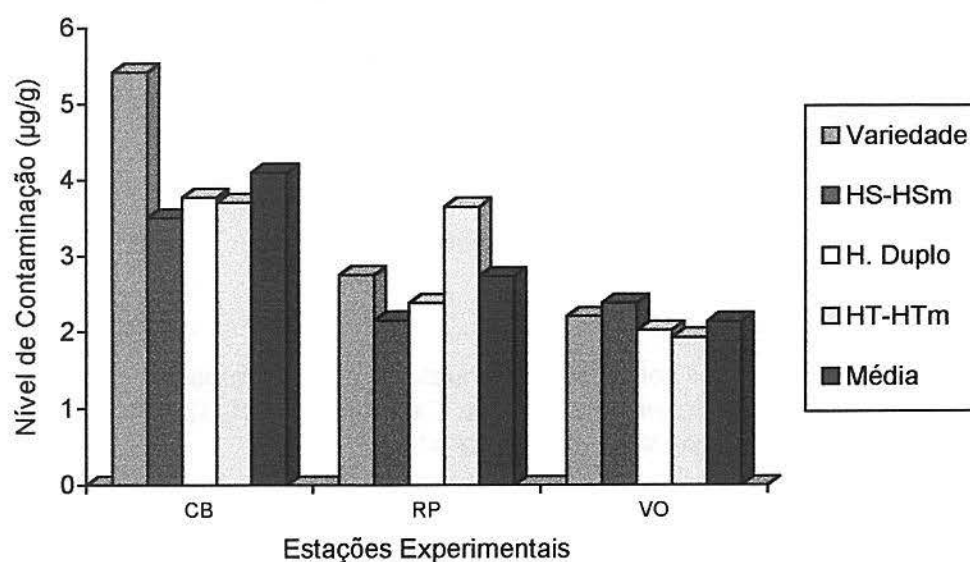


FIGURA 10. Fumonisinhas totais nos diferentes tipos de cultivares de milho em Capão Bonito (CB), Ribeirão Preto (RP) e Votuporanga (VO), da safra 94/95. (HS = híbrido simples; HSm = híbrido simples modificado; HT = híbrido triplo e HTm = híbrido triplo modificado).

Quando se analisa a contaminação de fumonisinas em relação ao tipo de endosperma, observa-se uma maior contaminação dos cultivares de grãos duro em Ribeirão Preto e Votuporanga, no entanto, em Capão Bonito não há diferença significativa (Figura 11). Dois cultivares com endosperma semidentado apresentaram maior contaminação de FB₂ do que de FB₁ (G 600 e XL 370). Os níveis de contaminação foram de 0,96 µg/g para FB₂ e de 0,65 µg/g de FB₁ no G 600 e de 0,18 µg/g para FB₂ e de 0,13 µg/g para FB₁ no

XL 370. Não foi observada correlação entre contaminação por fumonisinas e tipo de endosperma, no entanto os cultivares semidentados apresentaram contaminação abaixo da média nos três locais estudados.

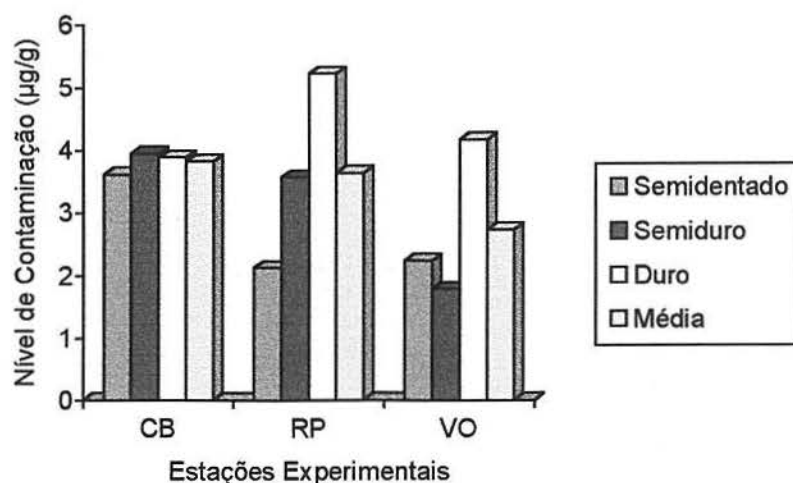


FIGURA 11. Fumonisinas totais em cultivares de milho agrupados conforme o tipo de endosperma, em amostras de Capão Bonito (CB), Ribeirão Preto (RP) e Votuporanga (VO), da safra de 94/95.

Em estudo realizado por VISCONTI (1996) não foi observada nenhuma interação entre híbrido e características de endosperma.

Quando se analisa a influência da duração do ciclo até o florescimento, na incidência de fumonisinas, pode-se observar que houve diferença significativa somente em Votuporanga, onde os cultivares super precoces estavam mais contaminados. No entanto, em Capão Bonito e Ribeirão Preto não houve diferença significativa (Figura 12). Não houve correlação entre ciclo e contaminação por fumonisinas, no entanto os cultivares com ciclo precoce apresentaram níveis de contaminação abaixo da média nos três locais estudados. Os híbridos G 600 e XL 370, ambos de ciclo precoce, apresentaram maiores níveis de FB₂ do que FB₁. Isto pode ter ocorrido devido a presença de cepas atípicas de *F. moniliforme* e/ou *F. proliferatum* que produzam mais FB₂ que FB₁. Cepas com este comportamento foram encontradas em um estudo realizado na Argentina (CHULZE *et alii*,

1996). Em um outro trabalho realizado com milho e derivados na Ásia, também foram observados maiores níveis de FB₂ do que FB₁, em alguns casos (SYDENHAM *et alii*, 1990).

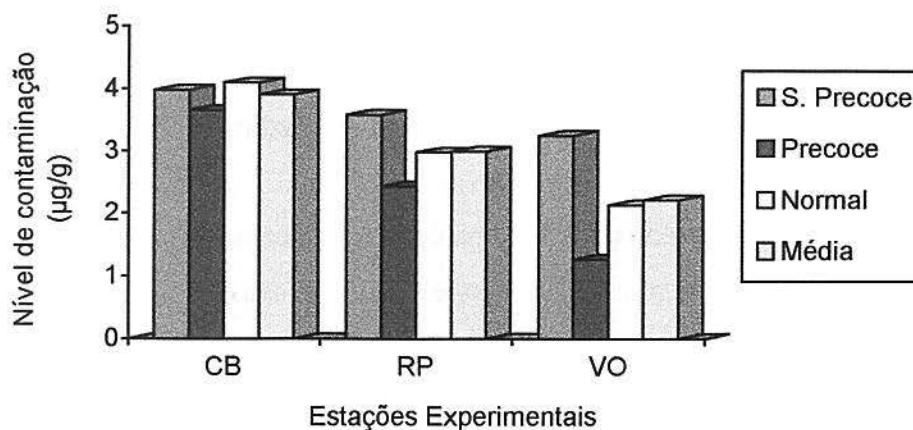


FIGURA 12. Fumonisinhas totais em cultivares de milho agrupados de acordo com o ciclo, em amostras de Capão Bonito (CB), Ribeirão Preto (RP) e Votuporanga (VO), na safra de 94/95.

A classificação por Número de Dias de Calendário (NDC) sugerida pela EMBRAPA (1996) considera como super precoces, cultivares que apresentam florescimento masculino abaixo de 60 dias, as precoces em torno de 65 dias e normais em torno de 70 dias. A época de semeadura afeta, principalmente, o ciclo da cultura e a produção dos grãos, o que torna o ciclo do cultivar de milho uma variável que merece atenção especial. O genótipo IAC 9643 E foi o que apresentou ciclo mais longo, apresentando contaminação por fumonisinhas acima da em Capão Bonito e Votuporanga.

Em Capão Bonito, foram 143 dias do plantio à colheita, sendo que o milho foi colhido por volta de 80 dias após o florescimento feminino. Em Ribeirão Preto, foram 176 dias de cultura e o milho foi colhido em torno de 115 dias após o florescimento. E, em Votuporanga foram 153 dias do plantio à colheita, com a mesma acontecendo cerca de 90 dias após o florescimento. Apesar do milho em Capão Bonito ter permanecido menos tempo no campo, observou-se neste local os maiores níveis de contaminação. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por CHULZE *et alii* (1994), que observaram

maior produção de fumonisinas aos 75 dias após o florescimento feminino, devido à maior presença de *Fusarium proliferatum* e *F. moniliforme* neste período e portanto uma maior ou menor permanência no campo não influenciaria no teor da toxina nos grãos. VISCONTI (1996) por sua vez observou uma ligeira correlação negativa entre a maior duração do ciclo vegetativo do cultivar e contaminação por fumonisinas. CHULZE *et alii* (1996) observaram baixos níveis de fumonisinas nos primeiros estágios de desenvolvimento. Nas amostras coletadas após a maturidade fisiológica, os níveis médios de FB₁, apresentaram-se acima de 1,0 µg/g.

O milho é atacado por vários patógenos que causam podridão dos grãos das espigas, com ocorrência em todas as regiões onde se cultiva, causada por *Fusarium moniliforme* e *F. moniliforme* var. *subglutinans* (EMBRAPA, 1997).

Atualmente tem sido dado ênfase à comparação da qualidade de grãos entre os cultivares comerciais para orientar a escolha das sementes. Os cultivares mais danificados por lagartas foram AGN 2003, IAC Taiúba, AG 1043 e G 600, demonstrando alta susceptibilidade à praga. Os cultivares que apresentaram maior porcentagem de grãos doentes foram IAC Taiúba, G 600, AGN 2003, C 701, AG 1043 e AG 510, indicando haver correlação positiva entre ataque de *Spodoptera frugiperda* e incidência de *Fusarium spp* (MEREGE *et alii*, 1996), o que contradiz os resultados obtidos por DUARTE *et alii* (1997) que compararam diferentes cultivares de milho “safrinha” e verificaram que a ocorrência de danos por lagartas ou de mal empalhamento não indica necessariamente elevada porcentagem de espigas com sintomas de *Fusarium spp* e *Diplodia spp*.

Em Votuporanga foram encontrados os menores níveis de contaminação por fumonisinas B₁ e B₂, (0,13 a 4,67 µg/g e 0,06 a 1,86 µg/g, respectivamente). ALMEIDA (1996) realizou um estudo da microbiota fúngica em 78 amostras de grãos de milho de três híbridos cultivados em diferentes regiões no Estado de São Paulo, na safra 94/95. Dentro do gênero *Fusarium*, a espécie *F. moniliforme* foi a mais freqüente nas regiões estudadas: Capão Bonito (50,0%), Ribeirão Preto (66,7%) e Votuporanga (16,7%). A menor contaminação com fumonisinas observada em Votuporanga poderia ser explicada pela menor freqüência de *F. moniliforme* encontrada por ALMEIDA (1996) em alguns híbridos analisados nesta mesma safra. No Brasil, outros autores também referem à alta freqüência de *F. moniliforme* (MEIRELLES *et alii*, 1994; POZZI *et alii*, 1995 e ORSI, 1995).

Em condições de campo houve alto índice de plantas acamadas + quebradas com porcentagem elevada de espigas tocando o solo. As maiores médias foram atingidas pelos cultivares BR 201, BR 205, IAC 4243 E e IAC 9643 E que são os menos indicados para colheita mecânica (MEREGE *et alii*, 1996). O cultivar IAC 9643 E apresentou níveis de contaminação por fumonisinas acima da média, dentre aqueles com alto índice de acamamento.

4. Influência dos fatores climáticos na produção de fumonisinas: os cultivares em Capão Bonito apresentaram maior contaminação, tanto de FB₁ (0,29 a 6,58 µg/g) quanto de FB₂ (0,11 a 2,15 µg/g), em relação aos outros locais estudados. Neste local, a temperatura variou de 15,9 a 29,0°C, com temperatura média de 22,9°C, o que é favorável ao crescimento do *Fusarium*, conforme NELSON *et alii* (1983). Pode-se observar também, que a partir de 60 dias de plantio, quando começa o florescimento feminino, houve uma diminuição nas temperaturas.

Os dados relativos as condições ambientais nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, na safra de 94/95 estão apresentados na Tabela 8.

TABELA 8. Condições ambientais nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico de Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, durante o crescimento do milho na safra de 94/95.

Estações Experimentais	Fatores Ambientais	Mês/Ano						
		Nov/94	Dez/94	Jan/95	Fev/95	Mar/95	Abr/95	Mai/95
Capão Bonito	TMa (°C)	27,8	28,7	29,0	27,0	27,4		
	TMi (°C)	15,9	17,9	19,2	18,7	17,1		
	IP (mm)	2,7	7,5	8,6	5,8	0,9		
Ribeirão Preto	TMa (°C)	28,6	30,9	30,7	29,0	30,4	28,5	27,6
	TMi (°C)	17,8	19,8	20,6	20,3	19,2	17,2	16,7
	IP (mm)	7,3	7,3	6,5	14,6	3,4	3,5	3,3
	UR (%)	74,4	79,2	79,2	83,2	75,2	73,8	76,9
Votuporanga	TMa (°C)	29,6	31,5	32,2	29,3	31,2	29,1	
	TMi (°C)	17,6	21,0	21,0	21,0	19,6	16,5	
	IP (mm)	6,5	6,5	5,3	21,6	3,6	3,4	

Dados obtidos no Centro de Ecofisiologia e Biofísica do Instituto Agronômico de Campinas.

TMa = temperatura máxima; TMi = temperatura mínima; IP = índice pluviométrico; UR = umidade relativa.

Pelas Figuras 13 e 14, onde estão representadas graficamente as médias das temperatura máximas e mínimas nos locais estudados, verificamos que em Capão Bonito ocorreram as menores temperaturas máximas e mínimas desde o plantio até a colheita do milho. Não houve diferença significativa entre temperaturas máximas observadas nos locais de plantio. Houve diferença significativa entre as temperaturas mínimas observadas nos locais de plantio após o florescimento feminino. Não foi observada correlação entre temperaturas no local de plantio e contaminação por fumonisinas.

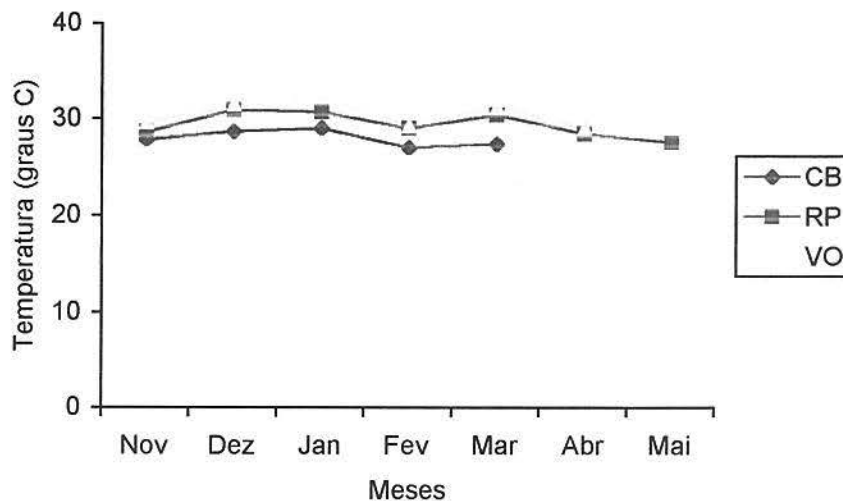


FIGURA 13. Temperaturas máximas (médias mensais) do plantio à colheita nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito (CB), Ribeirão Preto (RP) e Votuporanga (VO), na safra de 94/95.

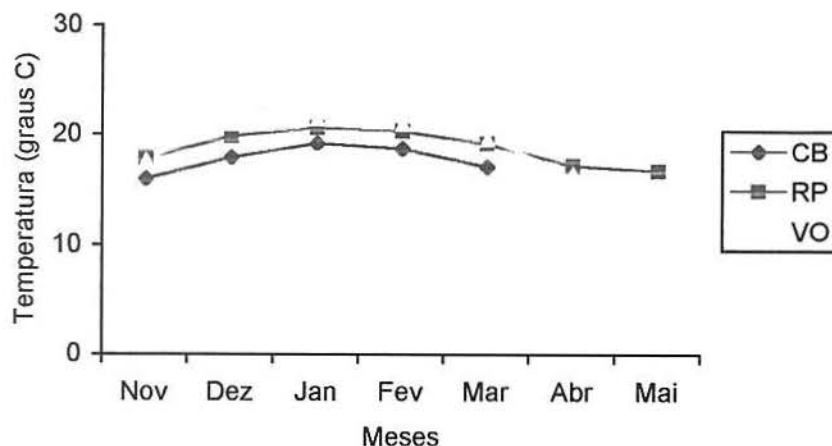


FIGURA 14. Temperaturas mínimas (médias mensais) do plantio à colheita nas Estações Experimentais do Instituto Agrônomo em Capão Bonito (CB), Ribeirão Preto (RP) e Votuporanga (VO), na safra de 94/95.

Observou-se que a quantidade de chuvas ocorridas durante a safra de 94/95 nas três Estações Experimentais determinou um perfil pluviométrico diferente entre elas. Houve diferença significativa entre índice pluviométrico nos locais de plantio após o florescimento feminino. Foi observada correlação negativa ($r = -0,96$) entre índice pluviométrico após o florescimento feminino e contaminação por fumonisinas. Em Capão Bonito houve uma redução drástica na quantidade de chuvas a partir do mês de janeiro, coincidindo com a época do florescimento feminino. Nos outros locais, foi a partir daí que aumentou a quantidade de chuvas (Figura 15). A Estação Experimental de Capão Bonito apresentou chuvas reduzidas durante o florescimento feminino acompanhadas de temperaturas amenas o que, segundo MILLER (1994) favorece o crescimento de *F. moniliforme*.

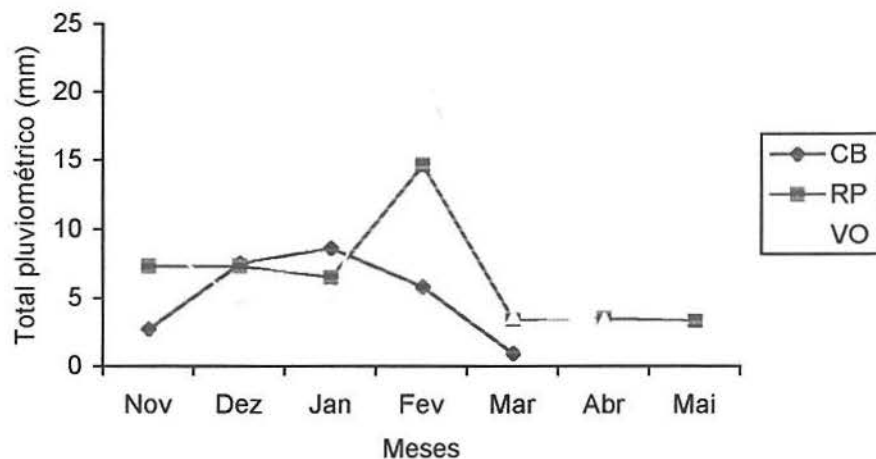


FIGURA 15. Índice pluviométrico (média diária) do plantio à colheita nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito (CB), Ribeirão Preto (RP) e Votuporanga (VO), na safra de 94/95.

Segundo MEREGE *et alii* (1996) as amostras utilizadas no presente trabalho foram colhidas com umidade dos grãos variando de 18,0 a 23,8%. O cultivar que apresentou a maior umidade nos grãos na época da colheita foi o AG 1043, que também apresentou a maior contaminação por fumonisinas B₁ e B₂ em Votuporanga, e contaminações acima da média em Capão Bonito. No entanto, não houve correlação entre a contaminação por fumonisinas e a umidade dos grãos logo após a colheita.

Os dados de umidade relativa do ar foram coletados apenas na Estação Experimental do Instituto Agronômico em Ribeirão Preto, e os valores variaram de 74,4 a 83,2%. Não foi possível verificar se há correlação entre contaminação por fumonisinas e umidade relativa do ar, porque as Estações Experimentais de Capão Bonito e Votuporanga não fazem a coleta destes dados.

CONCLUSÕES

Os teores de fumonisinas encontrados em 35 genótipos de milho plantados em três diferentes regiões do Estado de São Paulo na safra de 94/95 revelaram que 76,2% estão com contaminação acima de 1,0 µg/g, nível considerado suficientemente alto para causar preocupações para a saúde humana, e 7,6% estavam acima de 5,0 µg/g, portanto acima do recomendado pelo "Mycotoxin Committee of American Association of Veterinary Diagnosticians" para ração de equinos. Os resultados colocam o milho plantado no Estado de São Paulo dentre os mais contaminados do mundo.

Embora todos os cultivares analisados apresentassem contaminação por fumonisinas B₁ e B₂, pode-se concluir que as condições ambientais (índice pluviométrico) específicas de cada área de cultivo representaram um importante fator na formação das fumonisinas no milho. As diferenças nos níveis de fumonisinas encontradas em alguns cultivares em diferentes locais, sugerem a possibilidade da seleção de cultivares menos sensíveis ao *Fusarium* e ao acúmulo de fumonisinas adaptados para cada local em particular. No entanto nenhum dos cultivares apresentou imunidade à produção de fumonisinas.

Não foi observada nenhuma correlação entre contaminação por fumonisinas e tipo de cultivar, tipo de endosperma e ciclo vegetativo.

Apesar da diferença significativa entre as temperaturas mínimas observadas nas Estações Experimentais analisadas durante a safra 94/95, não foi observada nenhuma correlação entre temperatura ambiente e contaminação por fumonisinas.

Foi observada correlação negativa ($r = -0,96$) entre índice pluviométrico após o florescimento feminino e contaminação por fumonisinas. Chuvas reduzidas após o florescimento feminino apresentaram-se como um fator possivelmente importante para a produção de fumonisinas nos cultivares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A. P. **Microbióta fúngica e produção de aflatoxinas e fumonisinas, por cepas de *Aspergillus flavus* Link e *Fusarium moniliforme* Sheldon, de três híbridos de grãos de milho recém-colhido.** (Tese de Mestrado – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo), 1996.
- BACON, C. W., BENNETT, R. M., HINTON, D. M., VOSS, K. A. Scanning electron microscopy of *Fusarium moniliforme* within asymptomatic corn kernels and kernels associated with equine leukoencephalomalacia. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, p. 144-148, 1992.
- BOLING, M. B., GROGAN, C. O. Gene action affecting host resistance to *Fusarium* ear rot of maize. **Crop Science**, Madison, v. 5, p. 305-307, 1965.
- BRUNINI, O., SAWAZAKI, E., CAPUTI, E. Manejo agrometeorológico de pragas na cultura do milho visando à aplicação de agroquímicos: uma análise preliminar. In: SEMINÁRIO SOBRE A CULTURA DO MILHO “SAFRINHA”, 4, Assis, 1997. **Anais...** Campinas: IAC/CDV, 1997. p. 201-206.
- BUCCI, T., HANSEN, D. K., LABORDE, J. B. Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin fumonisin B₁. **Natural Toxins**, v. 4, p. 51-52, 1996.
- CAMARGO, A. P., PEDRO JÚNIOR, M. J., BRUNINI, O., ALFONSI, R. R., ORTOLANI, A. A., PINTO, H. S. **Zoneamento Agrícola do Estado de São Paulo.** São Paulo: Secretaria da Agricultura de São Paulo, 1974. 80 p.
- CAMARGOS, S. M., MACHINSKI Jr, M., SOARES, L. M. V. Avaliação de métodos para determinação de fumonisinas B₁ e B₂ em milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 58, n. 2, 1999 (no prelo).
- CHULZE, S. N., RAMIREZ, M. L., FARNOCHI, M. C., PASCALE, M., VISCONTI, A. *Fusarium* and fumonisins in Argentina. In: INTERNATIONAL MYCOLOGICAL CONGRESS, 5, Vancouver. **Abstract...** 1994. p. 37.
- CHULZE, S. N., RAMIREZ, M. L., FARNOCHI, M. C., PASCALE, M., VISCONTI, A. MARCH, G. *Fusarium* and fumonisin occurrence in argentinian corn at different ear maturity stages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 9, p. 2797-2801, Sept. 1996.
- DOKO, M. B., RAPIOR, S., VISCONTI, A., SCHJOTH, J. E. Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, p. 429-434, 1995.

- DUARTE, A. P., DUDIENAS, C., ITO, M. F., KANTHACK, R. A. D. Doenças em espigas de milho safrinha. In: SEMINÁRIO SOBRE A CULTURA DO MILHO SAFRINHA, 4, Assis, 1997. **Resumos...** Campinas: IAC/CDV, 1997. p. 129-133.
- DUARTE, A. P., PATERNIANI, M. E. A. G. Z. Avaliação de cultivares de milho no Estado de São Paulo. In: INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. **Cultivares de milho no Estado de São Paulo. Resultados das avaliações regionais IAC/CATI/EMPRESAS – 1997/98. Documentos IAC 62.** Campinas: IAC. 1998. p. 1-5.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Recomendações técnicas para o cultivo do milho**, 2ª ed. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996. p. 85-95.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Milho: informações técnicas.** Dourados: EMBRAPA/CPAO, 1997. p. 144-145; 168-170. (Circular Técnica, 5).
- FANCELLI, A. L., DOURADO-NETO, D. Milho: ecofisiologia e rendimento. In: FANCELLI, A. L., DOURADO-NETO, D. **Tecnologia de produção de milho.** Piracicaba: Publique. 1997. p. 157-170.
- GELDERBLUM, W. C. A., KRIEK, N. P. J., MARASAS, W. F. O., THIEL, P. G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁, in rats. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 12, n. 7, p. 1247-1251, July. 1991.
- GELDERBLUM, W. C. A., MARASAS, W. F. O., VLEGGAAR, R., THIEL, P. G., CAWOOD, M. E. Fumonisin: isolation, chemical characterization and biological effects. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, n. 1-2, p. 11-16, Feb. 1992.
- GERAGE, A. C. Cultivares. In: FUNDAÇÃO INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. **A cultura do milho no Paraná.** Londrina: IAPAR, 1991. p. 71-82. (Circular 68).
- HEADRICK, J. M., PATAKY, J. K. Maternal influence on the resistance of sweet corn lines to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, p. 268-274, 1991.
- HIROOKA, E. Y., YAMAGUSHI, M. M., AOYAMA, S., SUGIURA, Y., UENO, Y. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, n. 2, p. 173-183, Feb/Mar. 1996.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Anuário Estatístico do Brasil**, Rio de Janeiro, v. 56, p. 3-54; 3-55, 1996.
- KING, S. B., SCOTT, G. E. Genotypic differences in maize to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 71, n. 12, p. 1245-1247, Dec. 1981.

- LUNSFORD, J. N., FUTRELL, M. C., SCOTT, G. E. Maternal effects and type of gene action conditioning resistance to *Fusarium moniliforme* seedling blight in maize. **Crop Science**, Madison, v. 16, p. 105-107, 1976.
- MEIRELES, M. C. A., CORRÊA, B., FISCHMAN, O., GAMBALE, W., PAULA, C. R., CHACON-RECHE, N. O., POZZI, C. R. Mycoflora of the toxic feeds associated with equine leukoencephalomalacia (ELEM) outbreaks in Brazil. **Mycopathology**, Dordrecht, v. 127, p. 183-188, 1994.
- MEIRELES, M. C. A., CORRÊA, B., FISCHMAN, O., GAMBALE, W., PAULA, C. R., FONSECA, H. Leucoencefalomácia equina (LEME) no Brasil. II. Aspectos microbiológicos e micotoxicológicos dos surtos ocorridos nos anos de 1988 a 1990. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 7, São Paulo, 1992. **Resumo...** p. 18.
- MEREGE, W. H., SAWAZAKI, E., DUARTE, A. P. Milho. Resultados dos testes regionais de competição de cultivares comerciais, safra 94/95 – plantio de verão. **Documento Técnico CATI**, Campinas, n. 99, jan. 1996. 34 p.
- MILLER, J. D. Epidemiology of *Fusarium* ear diseases of cereals. In: MILLER, J. D., TRENHOLM, H. L. eds. **Mycotoxins in Grains- compounds other than aflatoxins**. St. Paul: Eagan Press, 1994. p. 19-36.
- NELSON, P. E., TOUSSOUN, T. A., MARASAS, W. F. O. ***Fusarium* species. An illustrated manual for identification**. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, 1983. 203 p.
- 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 and Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 4, p. 53-59, 1992.
- ORSI, R. B. **Microbiota fúngica em 3 híbridos de milho recém-colhido e armazenado**. São Paulo, 1995. (Tese de Mestrado – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo), 1995.
- POZZI, C. R., CORRÊA, B., GAMBALE, W., PAULA, C. R., CHACON-RECHE, N. O., MEIRELES, M. C. A. Post-harvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxins occurrence. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 12, n. 3, p. 313-319, May/June. 1995.
- 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 growth in Argentina. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 135, p. 29-34, 1996.

- RHEEDER, J. P., MARASAS, W. F. O., VAN WYK, P. S., DU TROIT, W., PRETORIUS, A. J., VAN SCHALKWYK, D. J. Incidence of *Fusarium* and *Diplodia* species and other fungi in naturally infected grain of South African maize cultivars. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 22, p. 97-102, 1990 a.
- RHEEDER, J. P., MARASAS, W. F. O., VAN WYK, P. S., VAN SCHALKWYK, D. J. Reaction of South African maize cultivars to ear inoculation with *Fusarium moniliforme*, *F. graminearum* and *Diplodia maydis*. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 22, p. 213-218. 1990 b.
- RILEY, R. T., NORRED, W. P., BACON, C. W. Fungal toxins in foods: recent concerns. **Annual Review of Nutrition**, Palo alto, v. 13, p. 167-189, 1993.
- ROSS, P. F., RICE, L. G., OSWEILER, G. D., NELSON, P. E., RICHARD, J. L., WILSON, T. M., RILEY, R. T. A review and update of animal toxicoses associated with fumonisin-contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, n. 1-2, p. 109-114, Feb. 1992.
- 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 cases. **Journal of Veterinary and Diagnostical Investigation**, Columbia, v. 3, p. 238-241, 1991.
- SANCHIS, V., ABADIAS, M., ONCINS, L., SALA, N., VIÑAS, I., CANELA, R. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn-based products from the Spanish Market. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 6, p. 2147-2148, June. 1994.
- SCOTT, R. A., KING, S. B. Site of action of factors for resistance to *Fusarium moniliforme* in maize. **Plant Disease**, St. Paul, v. 68, p. 804-806, 1984.
- SHELBY, R. A., WHITE, D. G., BAUSKE, M. E. Differential fumonisin production in maize hybrids. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, p. 582-584, 1994.
- SHEPHARD, G. S., SYDENHAM, E. W., THIEL, P. G., GELDERBLUM, W. C. A. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, New York, v. 13, n. 10, p. 2077-2087, Oct. 1990.
- SYDENHAM, E. W., MARASAS, W. F. O., SHEPHARD, G. S., THIEL, P. G., HIROOKA, E. Y. Fumonisin concentration in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, n. 6, p. 994-997, June. 1992.

- 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, v. 79, n. 3, p. 688-696, May/June. 1996.
- SYDENHAM, E. W., THIEL, P. G., MARASAS, W. F. O., SHEPHARD, G. S., VAN SCHALKWYK, D. J., KOCH, K. R. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 10, p. 1900-1903, Oct. 1990.
- THIEL, P. G., MARASAS, W. F. O., SYDENHAM, E. W., SHEPHARD, G. S., GELDERBLOM, W. C. A., RILEY, R. T., RICHARD, J. L. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 4, p. 1089-1093, Apr. 1991.
- TSUNECHIRO, A., OKAWA, H. Perspectivas da safrinha de milho em 1996. **Informativo Econômico**, v. 26, p. 343-360, 1996.
- Van RAIJ, B., CANTARELLA, H., QUAGGIO, J. A., FURLANI, A. M. C. Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. **Boletim Técnico do IAC**, Campinas, n. 100. 2^a. ed. 1996. 285 p.
- VISCONTI, A. Fumonisins in maize genotypes grown in various geographic areas. In: JACKSON, L. S., DEVRIES, J. W., BULLERMAN, L. B. **Fumonisins in food**, v. 392, 1996. p. 193-204.
- VISCONTI, A., DOKO, M. B., BOTTALICO, C., SCHURER, B., BOENKE, A. Stability of fumonisins (FB₁ and FB₂) in solution. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 11, p. 427-431, 1994.
- WALLER, J. M., BRAYFORD, D. TPM special review, *Fusarium* diseases in the tropics. **Tropical Pest Management**, v. 36, n. 3, p. 181-194, 1990.
- YAMAGUSHI, M. M., HIROOKA, E. Y., SHIBATA, T. M. M., HASSEGAWA, R. H., AOYAMA, S., SUGIURA, T. UENO, Y. Fumonisinas em milho no Estado do Paraná. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 7, São Paulo, 1992. **Resumo...** p. 27.
- YOSHIZAWA, T., YAMASHITA, A., LUO, Y. Fumonisin occurrence in corn from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 5, p. 1626-1629, May. 1994.
- ZONTA, E. P., MACHADO, A. A., SILVEIRA JUNIOR, P. **Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Manual de Utilização: Pelotas, 1987.

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

FUMONISINAS EM CULTIVARES DE MILHO NO ESTADO DE SÃO PAULO: INFLUÊNCIA DAS CARACTERÍSTICAS DO CULTIVAR E DAS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS DA SAFRA DE 97/98.

RESUMO

Cento e dez amostras, representando 52 genótipos de milho com diferentes tipos de cultivar, de endosperma e ciclo vegetativo, foram avaliadas quanto ao teor de fumonisinas e da influência de características e das condições climáticas na produção destas toxinas em três Estações Experimentais do Instituto Agrônomo (Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga) em São Paulo, durante a safra de 97/98. Todos os cultivares analisados estavam contaminados com fumonisinas em níveis que variaram de 1,15 µg/g a 43,80 µg/g de FB₁ e de 0,08 µg/g a 11,65 µg/g de FB₂. Mais de 67% das amostras continham níveis de fumonisinas acima de 1,0 µg/g. Não foi observada correlação entre concentração de fumonisinas e tipos de cultivar, de endosperma e do ciclo. Foi observada uma forte interação entre a contaminação por fumonisinas e o local de cultivo das amostras analisadas. Houve diferença significativa entre as temperaturas mínimas observadas nas Estações Experimentais estudadas durante a safra de 97/98. Não foi observada correlação entre temperaturas no local de plantio e contaminação por fumonisinas. Foi observada correlação negativa ($r = -0,99$) entre índice pluviométrico após o florescimento feminino e contaminação por fumonisinas. Embora todos os cultivares analisados apresentassem contaminação por fumonisinas B₁ e B₂, concluiu-se que as condições ambientais específicas de cada área de cultivo representaram um importante fator na formação das fumonisinas no milho.

INTRODUÇÃO

O milho se destaca entre as graníferas por ser o primeiro em área cultivada e volume de produção no país e pela participação preponderante das empresas privadas na pesquisa,

produção e comercialização das sementes melhoradas. Embora tenha pequena participação no mercado de sementes de milho e não seja responsável pela recomendação dos cultivares lançados (principalmente depois da extinção das Comissões de Recomendação de Cultivares), o Estado pode contribuir fornecendo informações para orientar técnicos e agricultores na escolha das sementes (DUARTE & PATERNIANI, 1998).

Em São Paulo, o Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e a Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI), órgãos da Secretaria de Agricultura e Abastecimento, e as Empresas de Pesquisa e Produção de Sementes estabeleceram parceria para a avaliação de cultivares de milho. Esse trabalho é inovador por utilizar apenas cultivares comerciais, estudar sua resistência às doenças, estratificar os ambientes visando à regionalização dos cultivares, proceder a análises de estabilidade e adaptabilidade e divulgar amplamente os resultados.

O milho, é constantemente exposto ao risco do desenvolvimento de fungos micotoxigênicos (ZUMMO & SCOTT, 1992). Inúmeras espécies de fungos associadas ao milho, principalmente dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, têm sido relatadas como produtoras de micotoxinas e como causadoras de micotoxicoses em animais domésticos e em humanos (MARASAS, 1988).

As fumonisinas são um grupo de micotoxinas produzidas principalmente por *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* e outras espécies da seção Liseola, sendo o milho o produto agrícola mais freqüentemente infectado. O *F. moniliforme* é uma espécie cosmopolita e saprófita, podendo produzir infecções assintomáticas (HEADRICK & PATAKY, 1991). A FB₁ causa leucoencefalomalácia em eqüinos - LEME (ROSS *et alii*, 1991), edema pulmonar e hidrotórax (EPS) em suínos (OSWEILER *et alii*, 1992), hemorragia cerebral em coelhos (BUCCI *et alii*, 1996) e câncer hepático em ratos (GELDERBLOM *et alii*, 1991). FB₂ e FB₃ também já foram associadas a câncer (GELDERBLOM *et alii*, 1992).

Poucas são as informações sobre os fatores que favorecem a produção de fumonisinas em milho (ALBERTS *et alii*, 1990; THIEL *et alii*, 1991; LE BARS *et alii*, 1994; SHELBY *et alii*, 1994). No Brasil, alguns trabalhos relataram a existência de surtos de LEME nos Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais (MEIRELES *et alii*, 1992), e Paraná (YAMAGUSHI *et alii*, 1992; SYDENHAM *et alii*,

1992). Milho proveniente do Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás apresentou-se contaminado com FB₁ e FB₂ HIROOKA *et alii* (1996).

Um dos enfoques possíveis na prevenção da contaminação por fumonisinas no milho é encontrar genótipos que sejam resistentes à infecção pelo *F. moniliforme* ou *F. proliferatum*, ou que não sejam susceptíveis à formação de fumonisinas. KING & SCOTT (1981) demonstraram diferenças varietais no milho em relação à infecção por *F. moniliforme* e mostraram pelo cruzamento entre variedades que a resistência é de herança genética. Produção diferenciada de fumonisinas foi constatada em 15 híbridos de milho plantados em diferentes localizações nos Estados Unidos (SHELBY *et alii*, 1994), na África do Sul (RHEEDER *et alii*, 1990), e em 98 amostras de genótipos de milho cultivados em vários países da Europa e da África (DOKO *et alii*, 1995). Apesar de não encontrarem cultivares isentos de fumonisinas, todos os autores concluíram que é importante selecionar cultivares de milho menos sensíveis à produção destas toxinas. Um outro aspecto que precisa ser entendido é a influência dos fatores climáticos na produção das fumonisinas.

NELSON *et alii* (1991) estudaram a toxigenicidade de 95 linhagens 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. No entanto, LESLIE *et alii* (1992) concluíram que a quantidade de fumonisina B₁ produzida depende mais do grupo da população a que pertence a linhagem do fungo do que da planta hospedeira ou origem geográfica da linhagem.

Uma avaliação da produção de fumonisinas em cultivares de milho plantados no Estado de São Paulo foi realizada na safra de 94/95. Observou-se então que 100% das amostras analisadas estavam contaminadas com fumonisinas, não havendo correlação com tipo de cultivar, endosperma ou ciclo vegetativo (CAMARGOS *et alii*, 2000).

O presente trabalho teve como objetivo estudar o comportamento de cultivares de milho plantados no Estado de São Paulo quanto a produção de fumonisinas, em uma segunda safra para verificar se as tendências observadas na safra de 94/95 eram mantidas. A avaliação dos teores de fumonisinas em milho recém-colhido em duas safras diferentes poderia vir a possibilitar uma melhor observação da influência dos fatores climáticos sobre

a produção destas toxinas. Foi ainda avaliada a influência das características agronômicas dos cultivares.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras: cento e dez amostras de milho correspondendo a 52 genótipos, foram coletadas nas Estações Experimentais do Instituto Agrônomo, de Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga. Todos os ensaios que deram origem às amostras foram desenvolvidos em condição de sequeiro, semeados em Capão Bonito no dia 16 de outubro de 1997 e colhidos no dia 16 de março de 1998 (151 dias do plantio à colheita); semeados em Ribeirão Preto no dia 02 de dezembro de 1997 e colhidos no dia 13 de abril de 1998 (133 dias do plantio à colheita); e semeados em Votuporanga no dia 17 de novembro de 1997 e colhidos no dia 26 de março de 1998 (130 dias do plantio à colheita). A adubação de plantio e de cobertura foi feita em função da análise química do solo, utilizando a Tabela de Adubação de Milho do IAC (Van RAIJ *et alii*, 1996). Todas as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos impermeáveis a água e armazenadas a -18°C até o momento da análise. A localização das Estações Experimentais no Estado de São Paulo pode ser observada na Figura 16.



FIGURA 16. Estações Experimentais utilizadas em 1997/98 no Estado de São Paulo: (1) Capão Bonito, (2) Ribeirão Preto e (3) Votuporanga.

Nas Tabelas 9 e 10, estão relacionados os cultivares que foram avaliados nos testes regionais de 97/98 nos ensaios das Estações Experimentais do Instituto Agrônomo, onde entraram 29 cultivares comuns nas três Estações, sendo os demais avaliados apenas em uma região.

TABELA 9. Relação e características dos cultivares de milho avaliados nas Estações Experimentais do Instituto Agrônomo em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, Estado de São Paulo, na safra de 97/98.

Produtores e/ou Criadores	Genótipos	Tipo de Cultivar ⁽¹⁾	Cor dos Grãos/Tipo de Endosperma	Ciclo ⁽²⁾
Agromen	AGN 2012	HD	Amarelo Semidentado	SP
CATI	AL 30	V	Laranja Semidentado	N
CATI	AL 34	V	Amarelo Semidentado	N
Agroeste	AS 3466	HT	Vermelho Duro	P
Novartis	Avant	HS	Laranja Semiduro	P
Unimilho	BR 3123	HT	Laranja Semiduro	P
Cargill	C 333 B	HSm	Amarelo Semiduro	N
Cargill	C 435	HD	Amarelo Semiduro	P
Cargill	C 444	HD	Amarelo Semiduro	P
Cargill	C 505	HT	Amarelo Semidentado	P
Cargill	C 806	HT	Amarelo Semiduro	SP
Cargill	C 909	HS	Amarelo Semiduro	SP
Colorado	Colorado 32	HT	Laranja Semiduro	P
Colorado	Colorado 42	HD	Laranja Semiduro	P
Colorado	Colorado 9560	HS	Laranja Semidentado	P
Dinamilho	Dina 766	HSm	Laranja Semiduro	SP
Dinamilho	Dina 1000	HSm	Laranja Semiduro	P
Novartis	Exceler	HT	Laranja Semidentado	P
Novartis	Master	HT	Amarelo Dentado	N
Ribeiral	MR 2601	HS	Amarelo Duro	P
Pioneer	P 3041	HT	Laranja Duro	P
Novartis	Savana	HT	Amarelo Semiduro	N
Braskalb	XL 251	HS	Laranja Semiduro	P
Braskalb	XL 345	HT	Laranja Semiduro	P
Braskalb	XL 360	HT	Amarelo Duro	P
Zeneca	Zeneca 8392	HS	Laranja Semiduro	SP
Zeneca	Zeneca 8440	HT	Amarelo Semiduro	P
Zeneca	Zeneca 8474	HS	Laranja Semiduro	P
Zeneca	Zeneca 8501	HT	Amarelo Semidentado	P

⁽¹⁾ HD = híbrido duplo; HT = híbrido triplo; HS = híbrido simples; HSm = híbrido simples modificado e V = variedade.

⁽²⁾ SP = super precoce; P = precoce e N = normal.

TABELA 10. Relação e características dos cultivares de milho avaliados em apenas uma das Estações Experimentais do Instituto Agronômico (Capão Bonito, Ribeirão Preto ou Votuporanga) na safra de 97/98.

Estação Experimental	Produtores e/ou Criadores	Genótipos	Tipo de Cultivar ⁽¹⁾	Cor dos Grãos/Tipo de Endosperma	Ciclo ⁽²⁾
Capão Bonito	Agrocere	AG 1043	HD	Amarelo Semidentado	N
	Agrocere	AG 1051	HD	Amarelo Dentado	N
	Agrocere	AG 5011	HT	Amarelo Semidentado	P
	Embrapa	BR 2121	HD	Amarelo Semiduro	N
	FT/Balu	FT 9043	HT	Laranja Semiduro	P
	Pioneer	P 3071	HT	Laranja Duro	P
	Braskalb	XL 269	HS	Laranja Duro	P
Ribeirão Preto	Agrocere	AG 1051	HD	Amarelo Dentado	N
	Agrocere	AG 4051	HD	Amarelo Dentado	N
	FT/Balu	FT 9043	HT	Laranja Semiduro	P
	IAC	IAC Taiuba	V	Amarelo Semidentado	P
	Pioneer	P 3021	HT	Laranja Semiduro	N
	Braskalb	XL 660	HD	Amarelo Semidentado	P
	Zeneca	Zeneca 8452	HS	Laranja Semidentado	P
Votuporanga	Agrocere	AG 106	HD	Amarelo Semidentado	N
	Agrocere	AG 405	HD	Laranja Semiduro	P
	Agrocere	AG 519	HD	Amarelo Semidentado	N
	Agrocere	AG 1043	HD	Amarelo Duro	SP
	Agrocere	AG 3010	HD	Amarelo Semidentado	P
	Embrapa	BR 201	HD	Laranja Semidentado	P
	Dinamilho	Dina 657	HSm	Laranja Semiduro	P
	Novartis	G 500	HT	Amarelo Semidentado	P
	Braskalb	XL 660	HD	Amarelo Semidentado	P

⁽¹⁾ HD = híbrido duplo; HT = híbrido triplo; HS = híbrido simples e HSm = híbrido simples modificado.

⁽²⁾ N = normal; P = precoce e SP = super precoce.

2. Avaliação das características agronômicas: as características agronômicas foram avaliadas nos laboratórios do Instituto Agronômico em Campinas. Os dados diários de temperatura máxima, mínima e média, e as precipitações pluviais foram coletados no Centro de Ecofisiologia e Biofísica do Instituto Agronômico de Campinas. Os resultados das análises das características dos genótipos de milho nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, na safra de 97/98 encontram-se no Documento IAC nº 62 (DUARTE & PATERNIANI, 1998).

3. Padrões de fumonisinas B₁ e B₂: soluções estoque individuais de fumonisinas B₁ e B₂ (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) foram preparadas pesando-se 1 mg e dissolvendo-se em 10 mL de acetonitrila:água (1+1) segundo VISCONTI *et alii* (1994), obtendo-se uma concentração de 100 µg/mL. Soluções de trabalho foram preparadas com concentrações de 50 µg/mL de FB₁ e de FB₂, respectivamente. Todas as soluções padrão foram armazenadas em frascos âmbar vedados, a -18°C.

4. Análise das fumonisinas: para a análise das fumonisinas foi utilizada a metodologia descrita por SHEPHARD *et alii* (1990) com algumas modificações, segundo CAMARGOS *et alii* (no prelo). As amostras de milho foram trituradas em moinho até atingirem um tamanho de 20 mesh. Cinquenta gramas da amostra foram homogeneizadas em liquificador com 100 mL de metanol:água (3+1, v/v) durante 5 minutos. A mistura foi centrifugada durante 10 minutos a 2000 rpm e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro. O filtrado teve o pH corrigido, quando necessário, para um pH entre 5,8–6,5 com hidróxido de sódio 1 M (somente 2 a 3 gotas). A limpeza do extrato filtrado foi feita em coluna de extração em fase sólida (SPE) por troca aniônica forte (SAX) após condicionamento da coluna. O condicionamento da coluna foi feito através de lavagens com 10 mL de metanol seguidos por 10 mL de metanol:água (3+1, v/v). Foram aplicados 10 mL do extrato filtrado na coluna e, lavados com 10 mL de metanol:água (3+1, v/v) seguidos por 6 mL de metanol. As fumonisinas B₁ e B₂ foram eluídas com 20 mL de metanol:ácido acético glacial (95+5, v/v). Durante a limpeza o fluxo dos solventes foi controlado a vácuo para que não excedesse a 1 mL/minuto. O eluato foi evaporado a 60°C sob atmosfera de nitrogênio. O resíduo concentrado foi lavado com 1 mL de metanol e novamente evaporado para garantir que todo o ácido acético fosse evaporado. O resíduo seco foi mantido em freezer até o momento da análise. A regeneração das colunas de troca aniônica forte foi realizada com 5 mL de HCl 0,1 M seguidos por 8 mL de água destilada, segundo SYDENHAM *et alii* (1996). As duplicatas foram feitas em colunas regeneradas.

Para a preparação dos padrões derivados foram transferidos 100 µL das soluções de trabalho das fumonisinas B₁ e B₂ (50+50 µg/mL) para um frasco e adicionados 200 µL do reagente OPA (dissolver 40 mg de OPA em 1 mL de metanol, diluir com 5 mL de tampão tetraborato de sódio 0,1 M e adicionar 50 µL de 2-mercaptoetanol), segundo SHEPHARD *et alii* (1990). Foi agitado em ultra-som a 5-15°C durante 30 segundos, e injetados 20 µL

após 60 segundos de reação. O reagente OPA foi acondicionado em frasco âmbar, coberto com papel alumínio e conservado por até 1 semana em temperatura de refrigeração.

Os extratos das amostras de milho foram redissolvidos em 500 μL de acetonitrila:água (1+1) e filtrados em filtros de 0,45 μm . Foram transferidos 100 μL deste extrato para um frasco, e adicionados 200 μL do reagente OPA. Foi agitado em ultra-som a 5-15°C durante 30 segundos, e injetados 20 μL após 60 segundos de reação. As fumonisinas foram analisadas por um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, consistindo de uma bomba M-510 (Waters Associates, Milford, MA) com alça de injeção de 20 μL e um injetor tipo Rheodyne Inc M-7125 (Cotati, CA) conectado a um detector de fluorescência HP1046A e um integrador HP3393A (Hewlett Packard, Avondale, PA). As separações foram feitas em coluna (250 mm x 4,6 mm) Varian (Walnut Creek, CA) empacotada com Microsorb-MV 5 μm ODS de fase reversa, usando uma fase móvel composta por acetonitrila:água:ácido acético glacial (50+50+0,5) até 15 minutos, seguida por acetonitrila pura. O tempo total de análise foi de 30 minutos. Após a corrida foram necessários 30 minutos para condicionar a coluna com a fase móvel inicial, antes da próxima injeção. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 nm e 440 nm, respectivamente. A vazão foi de 1,0 mL/minuto.

A identificação dos compostos analisados foi realizada através da comparação dos tempos de retenção estabelecidos com as amostras e os padrões. A quantificação dos compostos foi o da padronização externa, utilizando-se as áreas dos picos. Os limites de detecção do método foram definidos para nossas condições de trabalho, como a concentração das fumonisinas B₁ e B₂ presente na amostra que originou a menor área que permitia visualização inequívoca do pico.

5. Controle de qualidade analítico: as amostras foram analisadas em 3 séries de 10 e uma série de 8, sendo que cada série incluiu um teste de recuperação onde uma amostra controle, não contaminada naturalmente, foi fortificada ao nível de 2 $\mu\text{g/g}$ para fumonisinas B₁ e B₂. Os teores de fumonisinas encontrados nas amostras analisadas foram corrigidos de acordo com a recuperação encontrada na amostra controle artificialmente contaminada, pertencente a mesma série. Duplicatas de uma mesma amostra foram analisadas em dias diferentes, seguindo o mesmo esquema já descrito. Foram aceitos coeficientes de variação entre duplicatas de até 30%.

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

7. Análise estatística: nas Estações Experimentais, o delineamento utilizado foi o de látice quadrado, com 36 tratamentos e três repetições em todas as regiões. As parcelas foram constituídas de quatro linhas de 5,0 m de comprimento, empregando-se as duas centrais para as avaliações. O espaçamento foi de 0,9 m entre linhas e o número de plantas por metro igual a 5, correspondendo à população de 55.555 plantas por hectare. Foram colhidas todas as espigas das duas linhas centrais, da primeira repetição, e debulhadas. Os grãos foram homogeneizados e uma amostra representativa de 500 g do lote foi retirada para análise das fumonisinas. Para análise de variância dos dados de fumonisinas utilizou-se o modelo inteiramente casualizado e para comparação de médias, utilizou-se o teste de Tukey a 5%, sendo os dados processados em microcomputadores utilizando o programa de análise estatística – SANEST (ZONTA *et alii*, 1987).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Controle de qualidade analítico: as curvas padrão para FB₁ e FB₂ foram lineares de 0,02 a 10 µg/g e de 0,04 a 10 µg/g, respectivamente. Os limites de detecção do método foram 0,02 µg/g e 0,04 µg/g para FB₁ e FB₂, respectivamente. A recuperação do método modificado foi de 84 a 97% (média de 92%) para FB₁ e de 56 a 84% (média de 72%) para FB₂, conforme Tabela 11.

TABELA 11. Recuperação de amostras de milho enriquecidas com fumonisinas B₁ e B₂ como controle nas análises das amostras de milho cultivados nas Estações Experimentais do Instituto Agrônomo durante a safra de 97/98.

Colunas empregadas na limpeza do extrato	Recuperação (%)	
	FB ₁	FB ₂
Colunas de troca iônica novas	97	71
	96	70
	94	84
	80	59
Média	92	71
Colunas de troca iônica regeneradas	97	56
	96	70
	94	84
	87	78
	84	84
Média	92	74

A repetibilidade do método mostrou-se adequada com desvios padrão relativos (RSD) de 0,6% para FB₁ e 2,2% para FB₂. Todas as análises foram feitas em duplicatas. O desvio padrão entre duplicatas variou de 0,00 a 25,13 (o desvio padrão médio foi de 1,25). A repetibilidade das análises apresentou desvios padrão relativos (RSD) de 0,11 a 99,18% (o RSD médio foi de 27,34%). A quantificação foi executada comparando-se as áreas dos picos com as áreas dos padrões.

2. Incidência de fumonisinas: os níveis de fumonisinas B₁ e B₂, variaram significativamente ($p < 0,001$) entre locais e cultivares, sendo também significativa a interação cultivares x locais. Todos os cultivares analisados continham fumonisina B₁ (FB₁) em níveis que variaram de 1,15 µg/g a 43,80 µg/g (concentração média de 6,79 µg/g) e fumonisina B₂ (FB₂) em níveis que variaram de 0,08 µg/g a 11,65 µg/g (concentração média de 2,00 µg/g). A concentração total de fumonisinas variou de 1,27 µg/g a 52,53 µg/g (concentração média de 8,79 µg/g). A proporção de FB₂/FB₁ variou de 0,04 a 0,57. As maiores médias de contaminação foram encontradas em Ribeirão Preto, tanto para FB₁ como para FB₂. Os níveis de contaminação observados nos cultivares analisados na safra de 97/98 são maiores que os encontrados naqueles analisados na safra de 94/95 (CAMARGOS

et alii, 2000), cujos valores variaram de 0,13 $\mu\text{g/g}$ a 6,58 $\mu\text{g/g}$ (concentração média de 2,34 $\mu\text{g/g}$) para FB₁ e de 0,06 $\mu\text{g/g}$ a 2,15 $\mu\text{g/g}$ (concentração média de 0,59 $\mu\text{g/g}$) para FB₂.

Mais de 67% das amostras continham níveis de fumonisina B₁ acima de 1,0 $\mu\text{g/g}$, mas 42,7% estavam contaminadas com níveis superiores a 5,0 $\mu\text{g/g}$ (Figura 17) que, segundo as recomendações dadas pelo "Mycotoxin Committee of American Association of Veterinary Diagnostician" é um nível de contaminação preocupante. Segundo RILEY *et alii* (1993), são recomendados níveis menores que 5,0 $\mu\text{g/g}$ em ração para cavalos e outras espécies de eqüinos, 10,0 $\mu\text{g/g}$ para ração de suínos, e para gado de corte e frango de corte, 50,0 $\mu\text{g/g}$ na ração. Uma concentração de FB₁ maior que 10,0 $\mu\text{g/g}$ em ração pode causar leucoencefalomalácia (LEME) em eqüinos ROSS *et alii* (1992). Entretanto, concentrações menores de FB₁, 7,7 $\mu\text{g/g}$, foram associadas a LEME (THIEL *et alii*, 1991).

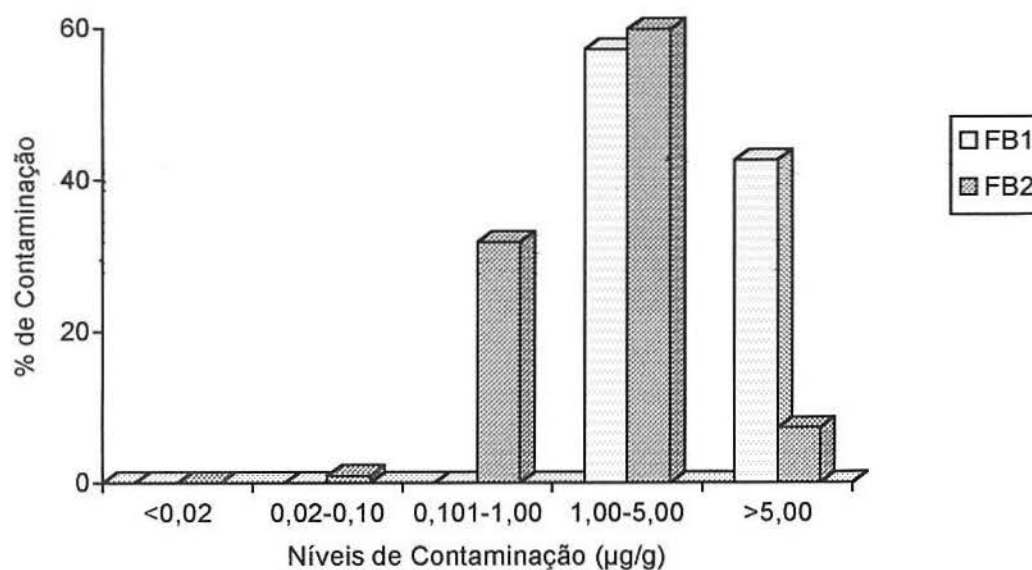


FIGURA 17. Distribuição de freqüência da contaminação por fumonisinas B₁ e B₂ em 52 cultivares de milho nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, na safra de 97/98.

Os resultados observados para incidência de fumonisinas no presente trabalho (1,15-43,80 $\mu\text{g/g}$ para FB₁ e de 0,08-11,65 $\mu\text{g/g}$ para FB₂) são maiores que os encontrados no

milho da região de Transkei, na África do Sul (0,45-18,90 µg/g para FB₁ e de 0,15-6,75 µg/g para FB₂), por SYDENHAM *et alii* (1990). Os resultados são ainda, maiores que os encontrados por HIROOKA *et alii* (1996) no norte do Paraná (0,60-12,55 µg/g para FB₁ e de 1,20-10,24 µg/g para FB₂). Os níveis de fumonisinas encontrados nas amostras de milho analisadas no Estado de São Paulo nas safras de 94/95 (CAMARGOS *et alii*, 2000) e de 97/98 são bastante elevados. Pode-se concluir então, que é necessário uma investigação maior, quanto à contaminação por fumonisinas, nos produtos destinados ao consumo humano no Brasil.

Em Capão Bonito e Ribeirão Preto a contaminação por fumonisinas foi bastante elevada, 50% e 69,4% das amostras apresentaram mais de 5,00 µg/g de FB₁, respectivamente, sendo que em Ribeirão Preto, 22,2% das amostras também apresentaram mais de 5,00 µg/g para FB₂. Em Votuporanga, os genótipos AL 30, AL 34, C 806 e XL 345, representando 10,5% das amostras continham níveis superiores a 5,00 µg/g para FB₁, sendo que 52,6% continham FB₂ acima de 1,00 µg/g.

Os resultados da incidência de fumonisinas B₁ e B₂ nos genótipos de milho analisados neste trabalho estão apresentados nas Tabelas 12 e 13.

TABELA 12. Médias de fumonisinas B₁ e B₂ em cultivares de milho avaliados nas Estações Experimentais do Instituto Agrônomo em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, na safra de 97/98.

Genótipos	Capão Bonito		Ribeirão Preto		Votuporanga	
	FB ₁ (µg/g)	FB ₂ (µg/g)	FB ₁ (µg/g)	FB ₂ (µg/g)	FB ₁ (µg/g)	FB ₂ (µg/g)
AGN 2012	4,06	0,96	12,27	3,60	3,82	1,47
AL 30	6,20	2,02	24,35	8,79	6,49	2,18
AL 34	3,96	1,44	3,00	1,20	7,64	4,11
AS 3466	3,27	0,50	36,41	10,79	3,64	0,91
Avant	6,03	1,04	20,68	5,56	4,08	0,94
BR 3123	4,50	0,53	4,95	1,43	2,20	1,09
C 333 B	7,64	1,34	1,44	0,44	2,57	0,60
C 435	6,29	1,49	20,61	5,83	1,15	0,12
C 444	5,45	1,17	5,16	1,21	3,16	0,94
C 505	2,08	1,16	5,30	0,89	1,48	0,28
C 806	4,51	1,21	3,60	0,74	5,49	1,44
C 909	2,33	0,66	8,67	2,85	3,41	1,04
Colorado 32	1,91	0,08	1,50	0,46	1,80	0,24
Colorado 42	22,20	4,83	5,33	1,03	4,35	1,52
Colorado 9560	1,28	0,42	43,80	8,72	1,94	0,51
Dina 766	11,33	3,05	5,61	1,12	2,24	0,86
Dina 1000	3,49	0,65	4,95	1,10	3,69	1,13
Exceler	2,69	0,65	18,58	4,31	2,66	0,61
Master	10,38	3,73	6,64	1,56	2,49	0,45
MR 2601	4,47	0,75	5,58	2,34	1,77	0,38
P 3041	8,60	2,98	5,11	2,00	4,29	1,90
Savana	12,15	2,43	9,41	2,31	4,59	2,63
XL 251	2,09	0,58	22,51	11,65	3,13	1,35
XL 345	7,31	2,81	30,14	7,67	6,98	2,28
XL 360	9,43	2,44	11,91	2,09	4,89	1,99
Zeneca 8392	7,52	1,99	2,38	0,73	3,74	0,97
Zeneca 8440	6,01	1,37	6,75	2,88	4,48	1,30
Zeneca 8474	8,42	2,78	3,69	1,67	3,55	1,32
Zeneca 8501	2,92	0,63	4,35	1,01	3,56	1,16
Média	6,15	1,58	11,54	3,31	3,63	1,23
Desvio Padrão	1,92	0,34	3,43	1,06	1,20	0,30
C. V. (%)*	59,6	53,9	59,6	53,9	59,6	53,9
dms * (Tukey a 5%)	16,32	4,24	16,32	4,24	16,32	4,24

Os resultados representam a média de duplicatas corrigidos para a recuperação.

Limites de detecção: FB₁ = 0,02 µg/g e FB₂ = 0,04 µg/g.

* Dados obtidos da análise de variância conjunta dos três locais.

TABELA 13. Médias de fumonisinas B₁ e B₂ em cultivares de milho avaliados nas Estações Experimentais do Instituto Agrônomo, na safra de 97/98.

Estação Experimental	Genótipos	Fumonisinas (µg/g)	
		B ₁	B ₂
Capão Bonito	AG 1043	9,49	2,76
	AG 1051	6,82	2,50
	AG 5011	3,33	0,65
	BR 2121	1,78	0,38
	FT 9043	1,63	0,45
	P 3071	4,48	1,17
	XL 269	7,96	2,73
	Média	5,08	1,52
	Desvio Padrão	0,80	0,30
Ribeirão Preto	AG 1051	12,25	3,69
	AG 4051	7,18	2,09
	FT 9043	2,57	1,01
	IAC Taiuba	25,69	8,60
	P 3021	8,33	2,88
	XL 660	5,28	2,00
	Zeneca 8452	2,76	1,02
	Média	9,15	3,04
	Desvio Padrão	1,71	0,86
Votuporanga	AG 106	2,40	0,89
	AG 405	4,13	1,62
	AG 519	4,82	1,90
	AG 1043	4,58	1,37
	AG 3010	3,83	1,89
	BR 201	2,31	0,56
	Dina 657	1,86	0,82
	G 500	2,85	0,69
	XL 660	2,60	1,08
	Média	3,26	1,20
	Desvio Padrão	0,79	0,31

Os resultados representam a média de duplicata corrigidos para a recuperação.

Limites de detecção: FB₁ = 0,02 µg/g e FB₂ = 0,04 µg/g.

ROSS *et alii* (1991) relataram a ocorrência de surtos de edema pulmonar em suínos quando a ração estava contaminada com 10 µg/g de FB₁. SYDENHAM *et alii* (1992) no entanto, relataram suspeitas de micotoxicose em suínos, aves e coelhos após a ingestão de ração contaminada com 7 µg/g de FB₁. Já BANE *et alii* (1992) encontraram níveis muito maiores de FB₁+FB₂ associadas a doenças em suínos, >31 µg/g. De qualquer maneira, os

níveis de contaminação encontrados no presente trabalho são muito altos e preocupantes, podendo causar surtos de micotoxicose nos animais que consumirem rações formuladas com este milho.

Os níveis médios de contaminação nos genótipos de milho analisados nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico na safra de 97/98 estão representados na Figura 18.

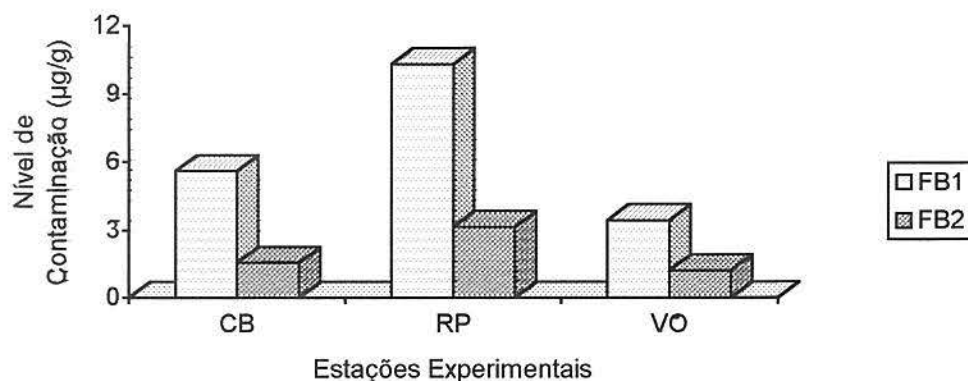


FIGURA 18. Níveis médios de contaminação por fumonisinas B₁ e B₂ nos cultivares de milho analisados nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito (CB), Ribeirão Preto (RP) e Votuporanga (VO), na safra de 97/98.

3. Influência das características agronômicas na produção de fumonisinas: a análise estatística dos dados mostrou haver uma forte interação entre contaminação por fumonisinas e o local de plantio dos cultivares. Não houve correlação entre contaminação por fumonisinas e tipo de cultivar nos genótipos analisados, híbridos triplos apresentaram níveis de contaminação abaixo da média nos três locais estudados. Na safra de 94/95 os híbridos duplos apresentaram níveis de contaminação abaixo da média, ressaltando mais uma vez a não correlação entre contaminação por fumonisinas e tipo de cultivar (CAMARGOS *et alii*, 2000). Pela Figura 19, pode-se observar que as variedades estavam mais contaminadas por fumonisinas em Ribeirão Preto e Votuporanga, enquanto em Capão Bonito, os híbridos duplos estavam mais contaminados.

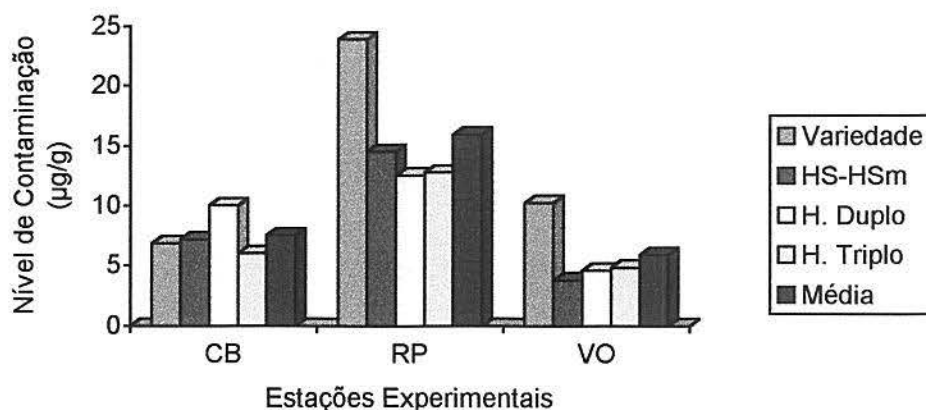


FIGURA 19. Níveis médios de fumonisinas totais nos tipos de cultivares de milho nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito (CB), Ribeirão Preto (RP) e Votuporanga (VO), na safra de 97/98. (HS = híbrido simples e HSm = híbrido simples modificado).

Em geral, existiram efeitos e interações significativas no que se refere aos fatores localização x híbrido, o que também foi observado por SHELBY *et alii* (1994). 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 opinaram que essas diferenças podem estar sob controle genético.

Quando se analisa a contaminação por fumonisinas em relação ao tipo de endosperma, observa-se que em Capão Bonito os cultivares com endosperma dentado estavam mais contaminados, sendo que em Ribeirão Preto e Votuporanga, os cultivares com grãos do tipo duro apresentaram contaminação acima da média. Estes resultados confirmam aqueles encontrados na safra de 94/95 (CAMARGOS *et alii*, 2000), onde os cultivares com endosperma duro estavam também, mais contaminados nestes dois locais. Não foi observada correlação entre tipo de endosperma e contaminação por fumonisinas (Figura 20).

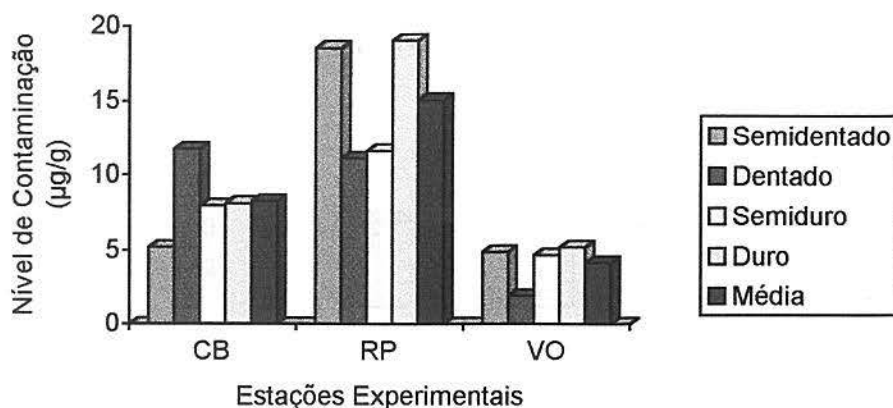


FIGURA 20. Níveis médios de fumonisinas totais em cultivares de milho com diferentes tipos de endosperma nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito (CB), Ribeirão Preto (RP) e Votuporanga (VO), na safra de 97/98.

Não houve correlação entre ciclo vegetativo e contaminação por fumonisinas, no entanto, os cultivares de ciclo super precoce apresentaram níveis de contaminação abaixo da média nos três locais estudados, ao contrário do ocorrido na safra de 94/95 (CAMARGOS *et alii*, 2000), onde os cultivares com ciclo super precoce estavam mais contaminados (Figura 21).

Os cultivares de ciclo precoce, AS 3466, CO 9560 e XL 345 apresentaram maiores níveis de contaminação por fumonisinas na média dos locais. Em Ribeirão Preto o grupo dos precoces diferenciou dos demais com maior nível de fumonisinas.

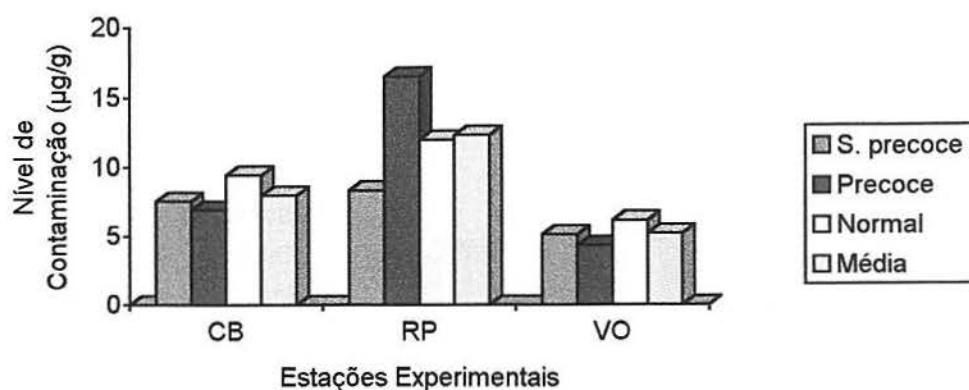


FIGURA 21. Níveis médios de fumonisinas totais em cultivares de milho agrupados de acordo com o ciclo vegetativo nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito (CB), Ribeirão Preto (RP) e Votuporanga (VO), na safra de 97/98.

Os resultados da avaliação dos caracteres agrônômicos de DUARTE & PATERNIANI (1998), mostraram que Capão Bonito apresentou as maiores médias de produtividade e maior ciclo até o florescimento masculino. Observaram-se ainda, elevados índices de acamamento e quebra de plantas, principalmente nos cultivares AL 30, AL 34, BR 2121, C 505, Dina 1000 e FT 9043, no entanto, somente os cultivares AL 30 e AL 34, ambos com cultivar do tipo variedade, apresentaram contaminação elevada por fumonisinas (8,22 µg/g para FB₁+FB₂ e 5,40 µg/g para FB₁+FB₂, respectivamente). Em Ribeirão Preto, os cultivares AL 30, Avant, XL 251, XL 360 e Zeneca 8392 apresentaram os maiores índices de plantas acamadas + quebradas. Com exceção do Zeneca 8392, todos os outros apresentaram níveis de contaminação por fumonisinas extremamente elevados. Em Votuporanga, os cultivares AL 34, C 505 e G 500 revelaram as maiores porcentagens de plantas acamadas + quebradas, no entanto somente o cultivar AL 34 apresentou elevado nível de contaminação por fumonisinas (11,75 µg/g de FB₁+FB₂). O cultivar AL 34 não é recomendado para colheita mecânica em nenhuma das Estações Experimentais estudadas. Os maiores índices de acamamento em alguns cultivares pode ser devido à presença de fungos apodrecedores do colmo em determinados locais.

PEREIRA (1995) relatou que o aumento da doença na cultura do milho está relacionado também com o surgimento de novas doenças, à implantação de uma cultura mais tecnificada, erosão de resistência, época de plantio e surgimento de novas raças de patógenos. Considerando-se que as doenças foliares, entre outras, são uma das causas de baixa produtividade e má qualidade dos grãos, torna-se imprescindível observar o material disponível para o cultivo, em condições edafoclimáticas variadas.

Na safra de 97/98, DUARTE & PATERNIANI (1998) relataram a ocorrência do complexo enfezamento/mosaico, ferrugem comum, o carvão e a podridão de *Fusarium spp* em espigas nos ensaios regionais. Em Votuporanga, apenas cinco cultivares mostraram um número maior que 10% de plantas com sintomas de enfezamento (doença causada por insetos): Avant, C 806, C 909, Dina 657 e Dina 766. Desses, Avant e C 806 apresentaram contaminação elevada por fumonisinas. O complexo enfezamento/mosaico foi constatado em Votuporanga, variando de baixa a alta incidência. No cultivar AL 34, a incidência de espigas com sintomas de doenças foi de 24%.

Na Estação Experimental em Capão Bonito ocorreu a ferrugem comum, causada pela *Puccinia sorghi*, com uma severidade de aproximadamente 50% de área foliar afetada no cultivar BR 2121. As doenças foliares ocorreram em intensidade relativamente alta em alguns cultivares, o que permite discriminar o grau de resistência apresentado por eles.

Com relação a espigas com grãos afetados por *Fusarium spp*, a maior incidência ocorreu em Capão Bonito, onde variou de 88% no cultivar XL 345, a 10% no Colorado 42, no entanto, o Colorado 42 foi o cultivar que apresentou maior nível de contaminação por fumonisinas. Em Votuporanga, o cultivar XL 345 também foi o mais danificado por lagartas, demonstrando alta susceptibilidade à praga, este cultivar apresentou contaminação por fumonisinas acima da média nos três locais. Outros cultivares que se destacaram pela alta porcentagem de espigas atacadas foram AS 3466, BR 201 e C 444, no entanto, em Ribeirão Preto o cultivar AS 3466 apresentou contaminação acima da média.

Os resultados apontaram uma interação significativa entre locais e cultivares, indicando que a incidência e severidade de doenças entre cultivares foi variável de um local para outro. Com base nas observações realizadas, verificou-se que a ocorrência de doenças foi diferenciada nas regiões avaliadas. Possivelmente, essa manifestação foi em função de:

condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento de patógenos, pelo acúmulo de inóculo no campo e/ou à diversidade de material genético.

4. Influência dos fatores climáticos na produção de fumonisinas: os cultivares em Ribeirão Preto apresentaram uma contaminação maior, tanto de FB₁ (1,44 a 43,80 µg/g) quanto de FB₂ (0,44 a 11,65 µg/g), em relação aos outros locais. Neste local, a temperatura variou de 17,91 a 31,10°C, com temperatura média de 25,14°C. Pode-se observar também, que as temperaturas mínimas diminuíram após os 60 dias de plantio, coincidindo com o início do florescimento feminino.

Os dados relativos as condições ambientais nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, na safra de 97/98 estão apresentados na Tabela 14.

TABELA 14. Condições ambientais nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, do plantio à colheita do milho na safra de 97/98.

Estações Experimentais	Condições Ambientais	Mês/Ano						
		Out/97	Nov/97	Dez/97	Jan/98	Fev/98	Mar/98	Abr/98
Capão Bonito	TMa (°C)	25,71	27,60	29,10	30,00	28,00	28,55	
	TMe (°C)	20,52	23,50	23,70	25,50	23,50	23,79	
	TMi (°C)	15,31	19,30	18,30	20,90	19,00	19,02	
	IP (mm)	2,21	7,50	5,30	6,50	6,20	12,34	
Ribeirão Preto	TMa (°C)			30,50	31,10	30,61	30,90	29,68
	TMe (°C)			25,25	25,74	25,64	25,30	23,78
	TMi (°C)			19,95	20,39	20,66	19,71	17,91
	IP (mm)			7,17	3,49	10,00	5,74	0,45
	UR (%)			81,07	78,39	81,40	79,78	72,22
Votuporanga	TMa (°C)*		30,86	32,00	32,90	31,90	32,19	
	TMe (°C)		25,83	26,50	27,00	26,70	26,60	
	TMi (°C)		20,76	21,00	21,20	21,40	21,00	
	IP (mm)		5,64	5,00	5,10	7,50	6,55	

Dados obtidos no Centro de Climatologia do Instituto Agronômico em Campinas.

A umidade relativa no mês de dez/97 foi determinada somente nas primeiras 3 semanas.

TMa = temperatura máxima; TMe = temperatura média; TMi = temperatura mínima; IP = índice pluviométrico e UR = umidade relativa.

Segundo THIEL *et alii* (1991), as fumonisinas, especialmente as B₁ e B₂, são facilmente produzidas quando cepas de *F. moniliforme* são cultivadas em milho a 25°C durante 21 dias. NELSON *et alii* (1983) verificaram que a temperatura de incubação ótima para o crescimento do *Fusarium spp* em culturas é de 25°C dia/20°C noite, embora este crescimento também ocorra em temperaturas constantes entre 20 e 25°C.

Nas Figuras 22 a 24, onde estão representadas graficamente as temperaturas máximas, médias e mínimas dos locais estudados, verificamos que em Capão Bonito foram relatadas as menores temperaturas desde o plantio até a colheita do milho, o que também foi observado na safra de 94/95 (CAMARGOS *et alii*, 2000). Houve diferença significativa entre as temperaturas mínimas nos locais de plantio, após o florescimento feminino. Não foi observada correlação entre temperatura ambiente e contaminação por fumonisinas.

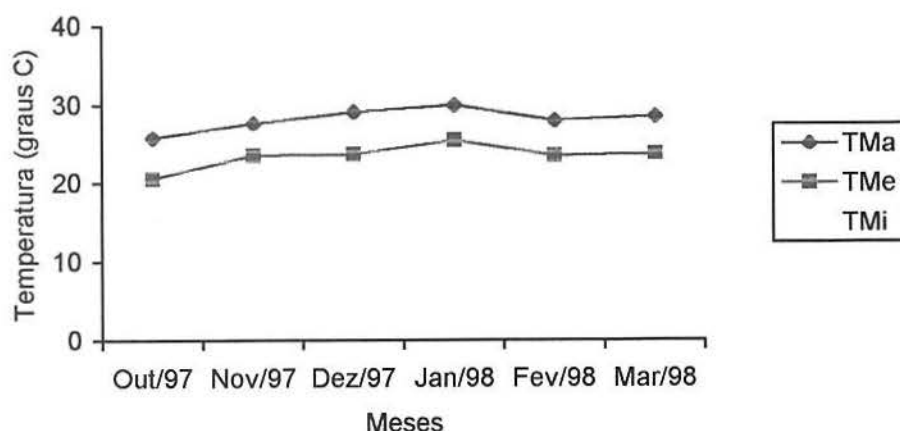


FIGURA 22. Temperaturas máximas (TMa), médias (TMe) e mínimas (TMi) do plantio à colheita na Estação Experimental do Instituto Agrônomo em Capão Bonito, na safra de 97/98.

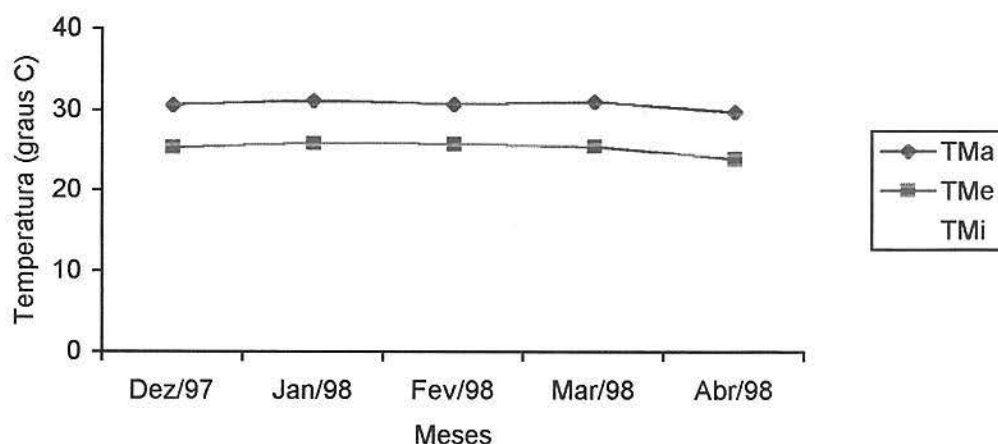


FIGURA 23. Temperaturas máximas (TMa), médias (TMe) e mínimas (TMI) do plantio à colheita na Estação Experimental do Instituto Agronômico em Ribeirão Preto, na safra de 97/98.

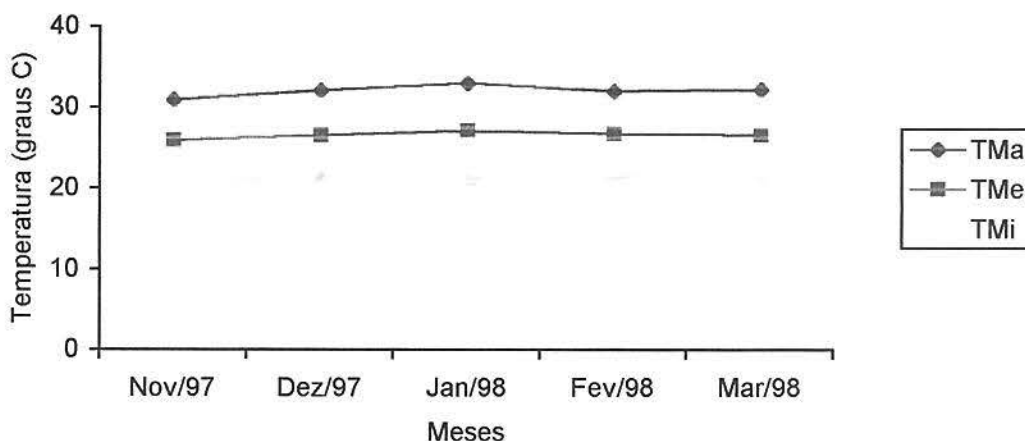


FIGURA 24. Temperaturas máximas (TMa), médias (TMe) e mínimas (TMI) do plantio à colheita na Estação Experimental do Instituto Agronômico em Votuporanga, na safra de 97/98.

Houve diferença significativa entre índice pluviométrico nos locais de plantio após o florescimento feminino. Foi observada correlação negativa ($r = -0,99$) entre quantidade de chuvas após o florescimento feminino e contaminação por fumonisinas. Em Ribeirão Preto houve uma redução drástica na quantidade de chuvas a partir do mês de fevereiro, coincidindo com a época do florescimento. Nos outros locais, a quantidade de chuvas

apresentou uma ligeira elevação a partir do florescimento (Figura 25). Na safra de 94/95, os cultivares plantados em Capão Bonito apresentaram maiores níveis de contaminação, ao contrário da safra de 97/98, onde a maior contaminação foi observada em Ribeirão Preto. No entanto, o perfil pluviométrico observado nos dois locais durante as duas safras analisadas, se assemelham nos casos em que cada local mostrou a maior contaminação dentre as três estudadas. A redução drástica de chuvas após o florescimento feminino mostra-se diretamente correlacionada com a produção de fumonisinas, independentemente das temperaturas registradas. Uma possível explicação é oferecida por SCHNEIDER & PENDERY (1983) que notaram que em épocas do ano com deficiência de água, a senescência da raiz do milho é acelerada, resultando no envelhecimento precoce da planta, o que aumenta a infecção pelo *F. moniliforme*.

Em 1997/98, a produtividade média das lavouras em Votuporanga foi influenciada pela irregularidade da distribuição das chuvas, predominando as “chuvas de manga”. Embora a maioria das lavouras semeadas em novembro tenham sido afetadas por veranicos (ausência de chuvas e calor intenso) na fase de florescimento e enchimento dos grãos, mesmo assim foram obtidas médias elevadas de produtividade. É possível que a baixa incidência de fumonisinas em Votuporanga seja explicada pelas características climáticas apresentadas nesta região, ou seja, temperaturas máximas geralmente acima de 30°C e índice pluviométrico na maioria das vezes acima de 5,0 mm.

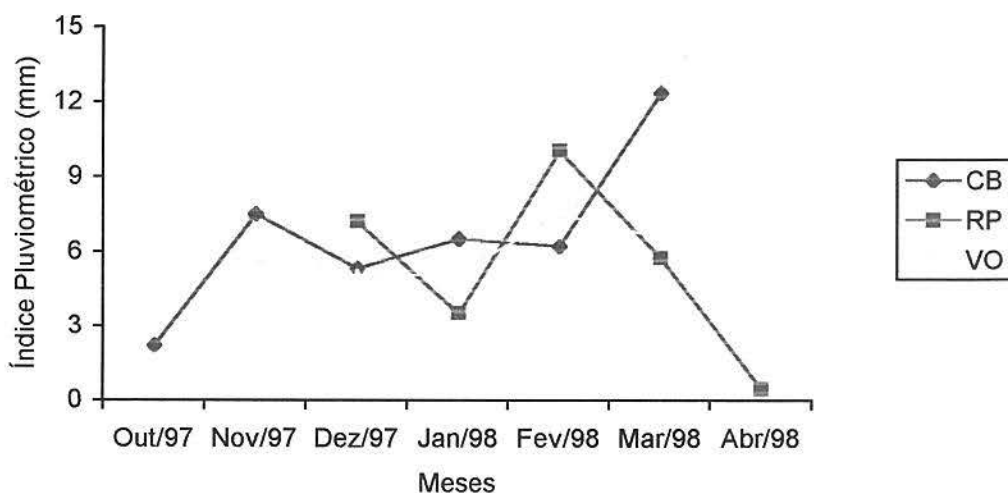


FIGURA 25. Índice pluviométrico (média diária) do plantio à colheita nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito (CB), Ribeirão Preto (RP) e Votuporanga (VO), na safra de 97/98.

As amostras utilizadas foram colhidas com umidade dos grãos variando de 13,4 a 22,0%. O cultivar que apresentou maior umidade nos grãos na época da colheita foi o Dina 1000. No entanto este cultivar apresentou baixos níveis de contaminação nos locais estudados. Não houve correlação entre a contaminação por fumonisinas e a umidade dos grãos logo após a colheita. Na safra de 94/95 os grãos foram colhidos com umidade variando de 18,0 a 23,8%, o que confirma o fato de não ter sido observada nenhuma correlação entre umidade dos grãos durante a colheita e a contaminação por fumonisinas.

Os dados de umidade relativa do ar foram coletados apenas na Estação Experimental do Instituto Agronômico em Ribeirão Preto, e os valores variaram de 72,22 a 81,4%. Na safra de 94/95 a umidade relativa do ar variou de 74,4 a 83,2%. Apesar de ter ocorrido maior quantidade de chuvas na safra de 97/98 em relação a safra de 94/95 a umidade relativa do ar não apresentou diferenças marcantes de um ano para o outro e portanto não pode ter influenciado a maior produção de fumonisinas em 97/98 em Ribeirão Preto. Segundo CHRISTENSEN & SAUER (1982) os fungos do gênero *Fusarium*, requerem para seu desenvolvimento, elevada umidade relativa do ar (80%) e altos teores de

umidade nos grãos (20-21%). Não foi possível verificar se há correlação entre contaminação por fumonisinas e umidade relativa do ar, porque as Estações Experimentais de Capão Bonito e Votuporanga não fazem a coleta destes dados.

CONCLUSÕES

Os teores de fumonisinas encontrados em 52 cultivares de milho plantados em três diferentes regiões do Estado de São Paulo na safra de 97/98 revelaram que mais de 67% das amostras estão com contaminação acima de 1,0 µg/g, nível este considerado suficientemente alto para causar preocupações para a saúde humana. Sendo que, 42,7% estavam acima de 5,0 µg/g, portanto acima do recomendado pelo “Mycotoxin Committee of American Association of Veterinary Diagnostician” para ração de equinos. Os resultados colocam o milho plantado no Estado de São Paulo dentre os mais contaminados do mundo.

Embora todos os cultivares analisados apresentassem contaminação por fumonisinas B₁ e B₂, pode-se concluir que as condições ambientais específicas de cada área de cultivo representaram um importante fator na formação das fumonisinas no milho. As diferenças nos níveis de fumonisinas encontradas em alguns cultivares em diferentes locais, sugerem a possibilidade da seleção de cultivares menos sensíveis ao *Fusarium* e ao acúmulo de fumonisinas adaptados para cada local em particular.

Não foi observada nenhuma correlação entre contaminação por fumonisinas e tipo de cultivar, tipo de endosperma e ciclo vegetativo, sendo o mesmo observado nos cultivares analisados durante a safra de 94/95 (CAMARGOS *et alii*, 2000).

Foi encontrada diferença significativa entre as temperaturas mínimas observadas nas Estações Experimentais estudadas após o florescimento feminino, no entanto, não foi observada nenhuma correlação entre temperatura ambiente e contaminação por fumonisinas, sendo o mesmo observado nos cultivares analisados durante a safra de 94/95 (CAMARGOS *et alii*, 2000).

Foi encontrada correlação negativa ($r = -0,99$) entre a contaminação por fumonisinas e o índice pluviométrico observado nas Estações Experimentais após o

florescimento feminino, sendo o mesmo observado nos cultivares analisados durante a safra de 94/95 (CAMARGOS *et alii*, 2000).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, v. 56, n. 6, p. 1729-1733, June. 1990.
- BANE, D. P., NEUMANN, E. J., HALL, W. F., HARLIN, K. S., SLIFE, R. L. N. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, p. 121-124, 1992.
- BUCCI, T., HANSEN, D. K., LABORDE, J. B. Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin fumonisin B₁. **Natural Toxin**, v. 4, p. 51-52, 1996.
- CAMARGOS, S. M., MACHINSKI Jr, M., SOARES, L. M. V. Otimização de métodos para determinação de fumonisinas B₁ e B₂ em milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 58, n. 2, 1999 (no prelo).
- CAMARGOS, S. M., VALENTE SOARES, L. M., SAWASAKI, E., SORDI, G., CASTRO, J. L., BORTOLETTO, N. Incidência de fumonisinas em cultivares de milho no Estado de São Paulo: Influência das características agronômicas e das condições climáticas na safra de 94/95. **Capítulo da tese para obtenção do título de Doutorado em Ciência de Alimentos pela Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP**. 2000.
- CHRISTENSEN, C. M., SAUER, D. B. Mycoflora. In: CHRISTENSEN, C. M. ed. **Storage of cereal grains and their products**. St. Paul: American Association of Cereal Chemists. 1982. p. 219-240.
- DOKO, M. B., RAPIOR, S., VISCONTI, A., SCHJOTH, J. E. Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, p. 429-434, 1995.
- DUARTE, A. D., PATERNIANI, M. E. A. G. Z. Cultivares de milho no Estado de São Paulo. **Documentos IAC**, Campinas, n. 62, 1998. 81 p.
- GELDERBLOM, W. C. A., KRIEK, N. P. J., MARASAS, W. F. O., THIEL, P. G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁, in rats. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 12, n. 7, p. 1247-1251, July. 1991.

- GELDERBLUM, W. C. A., MARASAS, W. F. O., VLEGGAAR, R., THIEL, P. G., CAWOOD, M. E. Fumonisin: isolation, chemical characterization and biological effects. *Mycopathologia*, Dordrecht, v. 117, n. 1-2, p. 11-16, Feb. 1992.
- HEADRICK, J. M., PATAKY, J. K. Maternal influence on the resistance of sweet corn lines to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 81, p. 268-274, 1991.
- HIROOKA, E. Y., YAMAGUSHI, M. M., AOYAMA, S., SUGIURA, Y., UENO, Y. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. *Food Additives and Contaminants*, London, v. 13, n. 2, p. 173-183, Feb/Mar. 1996.
- KING, S. B., SCOTT, G. E. Genotypic differences in maize to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 71, n. 12, p. 1245-1247, Dec. 1981.
- 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, v. 77, n. 2, p. 517-521, Mar/Apr. 1994.
- 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). *Mycopathologia*, Dordrecht, v. 82, n. 3, p. 341-345, 1992.
- MARASAS, W. F. O. Medical relevance of mycotoxins in southern Africa. *Microbiology of Aliments and Nutrition*, v. 6, p. 1-5, 1988.
- MEIRELES, M. C. A., CORRÊA, B., FISCHMAN, O., GAMBALE, W., PAULA, C. R., FONSECA, H. Leucoencefalomalácia equina (LEME) no Brasil. II. Aspectos microbiológicos e micotoxicológicos dos surtos ocorridos nos anos de 1988 a 1990. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 7, São Paulo, 1992. **Resumo...** p. 18.
- 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, v. 57, n. 8, p. 2410-2412, Aug. 1991.
- NELSON, P. E., TOUSSOUN, T. A., MARASAS, W. F. O. *Fusarium species. An illustrated manual for identification*. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, 1983. 203 p.
- 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 and Diagnostic Investigation*, Columbia, v. 4, p. 53-59, 1992.

- PEREIRA, O. A. P. Análise da situação atual de doenças de milho no Brasil e disponibilidade de germoplasma resistente. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 21, n. 1, p. 67-69, 1995.
- RHEEDER, J. P., MARASAS, W. F. O., VAN WYK, P. S., VAN SCHALKWYK, D. J. Reaction of South African maize cultivars to ear inoculation with *Fusarium moniliforme*, *F. graminearum* and *Diplodia maydis*. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 22, p. 213-218, 1990.
- RILEY, R. T., NORRED, W. P., BACON, C. W. Fungal toxins in foods: recent concerns. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 13, p. 167-189, 1993.
- ROSS, P. F., RICE, L. G., OSWEILER, G. D., NELSON, P. E., RICHARD, J. L., WILSON, T. M., RILEY, R. T. A review and update of animal toxicoses associated with fumonisin-contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, n. 1-2, p. 109-114, Feb. 1992.
- ROSS, P. F., RICE, L. G., PLATTNER, R. D., OSWEILER, G. D., WILSON, T. M., OWENS, D. L., NELSON, H. A., RICHARD, J. L. Concentrations of fumonisin B₁ in feeds associated with animal health problems. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 114, p. 129-135, 1991.
- SCHNEIDER, R. W., PENDERY, W. E. Stalk rot of corn: mechanism of predisposition by an early season stress. **Phytopathology**, St. Paul, v. 73, p. 863-871, 1983.
- SHELBY, R. A., WHITE, D. G., BAUSKE, M. E. Differential fumonisin production in maize hybrids. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, p. 582-584, 1994.
- SHEPHARD, G. S., SYDENHAM, E. W., THIEL, P. G., GELDERBLUM, W. C. A. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, New York, v. 13, n. 10, p. 2077-2087, Oct. 1990.
- SYDENHAM, E. W., MARASAS, W. F. O., SHEPHARD, G. S., THIEL, P. G., HIROOKA, E. Y. Fumonisin concentrations in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, n. 6, p. 994-997, June. 1992.
- 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, v. 79, n. 3, p. 688-696, May/June. 1996.

- 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 oesophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 10, p. 1900-1903, Oct. 1990.
- THIEL, P. G., MARASAS, W. F. O., SYDENHAM, E. W., SHEPHARD, G. S., GELDERBLUM, W. C. A., NIEUWENHUIS, J. J. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 4, p. 1089-1093, Apr. 1991.
- Van RAIJ, B., CANTARELLA, H., QUAGGIO, J. A., FURLANI, A. M. C. Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. **Boletim Técnico do IAC**, Campinas, n. 100. 2^a. ed. 1996. 285 p.
- VISCONTI, A., DOKO, M. B., BOTTALICO, C., SCHURER, B., BOENKE, A. Stability of fumonisins (FB₁ and FB₂) in solution. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 11, p. 427-431, 1994.
- YAMAGUSHI, M. M., HIROOKA, E. Y., SHIBATA, T. M. M., HASSEGAWA, R. H., AOYAMA, S., SUGIURA, T. UENO, Y. Fumonisin em milho no Estado do Paraná. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 7, São Paulo, 1992. **Resumo...** p. 27.
- ZONTA, E. P., MACHADO, A. A., SILVEIRA JUNIOR, P. **Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Manual de Utilização: Pelotas, 1987.
- ZUMMO, N., SCOTT, G. E. Interaction of *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus flavus* on kernel infection and aflatoxin contamination in maize ears. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, p. 771-773, 1992.

FUMONISINAS EM CULTIVARES DE MILHO DE DIFERENTES REGIÕES E SAFRAS DO ESTADO DE SÃO PAULO.

RESUMO

Quarenta e oito amostras de milho recém-colhidos, representando oito genótipos com diferentes tipos de cultivar, endosperma e duração do ciclo vegetativo foram avaliados quanto ao teor de fumonisinas e a influência das características e das condições climáticas na produção destas toxinas em três Estações Experimentais do Instituto Agrônomo (Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga) em São Paulo, durante as safras de 94/95 e 97/98. Todos os cultivares analisados estavam contaminados com fumonisinas em níveis que variaram de 0,36 µg/g a 3,43 µg/g para FB₁ e de 0,06 µg/g a 1,47 µg/g para FB₂ durante a safra de 94/95 e de 1,50 µg/g a 22,20 µg/g para FB₁ e de 0,08 µg/g a 4,83 µg/g para FB₂, durante a safra de 97/98. Todas as amostras continham níveis de fumonisinas acima de 1,0 µg/g. Não foi observada correlação entre concentração por fumonisinas e tipos de cultivar, de endosperma, ou duração do ciclo vegetativo. Foi observada uma forte interação entre a contaminação por fumonisinas e o local de cultivo das amostras analisadas. Não foi observada correlação entre temperatura ambiente e contaminação por fumonisinas. A comparação dos resultados da incidência de fumonisinas em dois anos por região indica uma grande diferença de comportamento dos cultivares quanto ao acúmulo de fumonisinas. Embora todos os cultivares analisados apresentassem contaminação por fumonisinas B₁ e B₂, pode-se concluir que as condições ambientais específicas de cada área de cultivo representaram um importante fator na formação das fumonisinas no milho. As diferenças nos níveis de fumonisinas encontrados em alguns cultivares em diferentes Estações Experimentais, sugerem a possibilidade da seleção de cultivares menos sensíveis ao *Fusarium*, e ao acúmulo de fumonisinas para uso em locais específicos. Ficou evidenciada a necessidade de empregar mais de um ano agrícola para observar a resistência dos cultivares de milho ao *Fusarium*, bem como a experimentação regional na caracterização de genótipos mais adaptados e/ou resistentes em cada condição edafoclimática.

INTRODUÇÃO

As fumonisinas, um grupo de micotoxinas produzidas por *Fusarium moniliforme* GELDERBLOM *et alii*, 1988; SEZUIDENHOUT *et alii*, 1988), tem sido encontradas naturalmente no milho e derivados e são associadas com doenças nos animais (ROSS *et alii*, 1991, 1992; SYDENHAM *et alii*, 1992). Fumonisina B₁ (FB₁) tem sido relacionada como a causa da leucoencefalomalácia equina (KELLERMAN *et alii*, 1990), edema pulmonar suíno (HARRISON *et alii*, 1990) e câncer hepático em ratos (GELDERBLOM *et alii*, 1991). As fumonisinas tem sido encontradas em alimentos a base de milho consumidos por humanos (SYDENHAM *et alii*, 1991; PITTET *et alii*, 1992; RHEEDER *et alii*, 1992; THIEL *et alii*, 1992). A ocorrência de fumonisinas em milho foi correlacionada com altas taxas de câncer de esôfago em Transkei, África do Sul (MARASAS *et alii*, 1988), e na China (ZHEN, 1984).

A ocorrência de fumonisinas na Europa foi primeiro relatada em espigas de milho infectadas por *F. verticilloides* (= *F. moniliforme*) na Áustria (LEW *et alii*, 1991). Desde então, vários trabalhos mostraram a ocorrência natural de fumonisinas em milho da Polônia e França, em milho importado pela Itália da França, Grécia, e Argentina e em várias amostras de alimentos a base de milho coletados na Itália.

Contaminação por fumonisinas na Argentina foi relatada no milho colhido na Província de Buenos Aires (SYDENHAM *et alii*, 1993). Relativamente baixos níveis de fumonisinas foram encontrados nas amostras de milho argentino (safra 1991) exportado para a África do Sul (RHEEDER *et alii*, 1994).

Vários trabalhos relataram a presença do *F. moniliforme* no milho brasileiro (SALGADO & CARVALHO, 1980; WENTZ *et alii*, 1981; LILLEHOJ & ZUBER, 1988), no entanto poucos foram os trabalhos que determinaram a presença das fumonisinas em milho no nosso país (YAMAGUSHI *et alii*, 1992; MEIRELES *et alii*, 1992; SYDENHAM *et alii*, 1992; e HIROOKA *et alii*, 1994 e 1996). Tendo em vista o número reduzido de publicações sobre a incidência de fumonisinas no milho brasileiro, e o fato de nenhum ter relatado o comportamento de cultivares frente a este tipo de contaminação, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento de cultivares de milho plantados no

Estado de São Paulo quanto a produção de fumonisinas B₁ e B₂ em duas safras não consecutivas, 94/95 e 97/98. Com a observação do comportamento dos mesmos cultivares de milho em diferentes regiões e em diferentes safras, torna-se possível verificar como fatores específicos como características agronômicas e climáticas influenciam a produção de fumonisinas quando o fator variabilidade genética é mantido sob controle.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras: foram utilizadas 48 amostras de milho provenientes de oito genótipos plantados durante duas safras não consecutivas (94/95 e 97/98) em três Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga. Na safra de 94/95, os cultivares foram semeados no dia primeiro de novembro de 1994 e colhidos no dia 23 de março de 1995 (143 dias do plantio à colheita) em Capão Bonito; em Ribeirão Preto foram semeados no dia 23 de novembro de 1994 e colhidos no dia 17 de maio de 1995 (176 dias do plantio à colheita); e em Votuporanga a semeadura ocorreu no dia 24 de novembro de 1994 e a colheita no dia 25 de abril de 1995 (153 dias do plantio à colheita).

Na safra de 97/98, os cultivares foram semeados no dia 16 de outubro de 1997 e colhidos no dia 16 de março de 1998 (151 dias do plantio à colheita) em Capão Bonito; semeados no dia 02 de dezembro de 1997 e colhidos no dia 13 de abril de 1998 (133 dias do plantio à colheita) em Ribeirão Preto; e semeados no dia 17 de novembro de 1997 e colhidos no dia 26 de março de 1998 (130 dias do plantio à colheita) em Votuporanga. Todas as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos impermeáveis a água e armazenadas a -18°C até o momento da análise.

Na Tabela 15, estão relacionados os oito cultivares avaliados nos testes regionais de 94/95 e 97/98 nos ensaios das Estações Experimentais do Instituto Agronômico.

TABELA 15. Relação e características dos cultivares de milho avaliados consecutivamente nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, nas safras de 94/95 e 97/98.

Produtores e/ou Criadores	Genótipos	Tipo de Cultivar ⁽¹⁾	Cor dos Grãos/Tipo de Endosperma	Ciclo ⁽²⁾
Agromen	AGN 2012	HD	Amarelo Semidentado	SP
CATI	AL 34	V	Amarelo Semidentado	N
Colorado	Colorado 32	HT	Laranja Semiduro	P
Colorado	Colorado 42	HD	Laranja Semiduro	P
Dinamilho	Dina 766	HSm	Laranja Semiduro	SP
Pioneer	P 3041	HT	Laranja Duro	P
Zeneca	Zeneca 8392	HS	Laranja Semiduro	SP
Zeneca	Zeneca 8501	HT	Amarelo Semidentado	P

⁽¹⁾ HD = híbrido duplo; V = variedade; HT = híbrido triplo e HSm = híbrido simples modificado.

⁽²⁾ SP = super precoce; N = normal e P = precoce.

2. Avaliação das características agronômicas: as características agronômicas foram avaliadas nos laboratórios do Instituto Agronômico em Campinas. Os dados diários de temperatura máxima, mínima e média, umidade relativa do ar e as precipitações pluviais foram coletados no Centro de Ecofisiologia e Biofísica do Instituto Agronômico de Campinas

Os resultados das análises das características agronômicas dos cultivares de milho nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, na safra de 94/95 encontram-se no Documento Técnico n° 99 da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral – CATI (MEREGE *et alii*, 1996). Os resultados das análises da safra de 97/98 encontram-se no Documento IAC n° 62 (DUARTE & PATERNIANI, 1998).

3. Padrões de fumonisinas B₁ e B₂: soluções estoques individuais de fumonisinas B₁ e B₂ (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) foram preparadas pesando-se 1 mg e dissolvendo-se em 10 mL de acetonitrila:água (1+1) segundo VISCONTI *et alii* (1994), obtendo-se uma concentração de 100 µg/mL. Soluções de trabalho foram preparadas com concentrações de 50 µg/mL de FB₁ e de FB₂, respectivamente. Todas as soluções padrão foram armazenadas em frascos âmbar vedados, a -18°C.

4. Análise das fumonisinas: para a análise das fumonisinas foi utilizada a metodologia descrita por SHEPHARD *et alii* (1990) com algumas modificações, segundo CAMARGOS *et alii* (1999). As amostras de milho foram trituradas em moinho até atingirem um tamanho de 20 mesh. Cinquenta gramas da amostra foram homogeneizadas em liquidificador com 100 mL de metanol:água (3+1, v/v) durante 5 minutos. A mistura foi centrifugada durante 10 minutos a 2000 rpm e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro. O filtrado teve o pH corrigido, quando necessário, para um pH entre 5,8–6,5 com hidróxido de sódio 1 M (somente 2 a 3 gotas). A limpeza do extrato filtrado foi feita em coluna de extração em fase sólida (SPE) por troca aniônica forte (SAX) após condicionamento da coluna. O condicionamento da coluna foi feito através de lavagens com 10 mL de metanol seguidos por 10 mL de metanol:água (3+1, v/v). Foram aplicados 10 mL do extrato filtrado na coluna e, lavados com 10 mL de metanol:água (3+1, v/v) seguidos por 6 mL de metanol. As fumonisinas B₁ e B₂ foram eluídas com 20 mL de metanol:ácido acético glacial (95+5, v/v). Durante a limpeza o fluxo dos solventes foi controlado a vácuo para que não excedesse a 1 mL/minuto. O eluato foi evaporado a 60°C sob atmosfera de nitrogênio. O resíduo concentrado foi lavado com 1 mL de metanol e novamente evaporado para garantir que todo o ácido acético fosse evaporado. O resíduo seco foi mantido em freezer até o momento da análise. A regeneração das colunas de troca aniônica forte foi realizada com 5 mL de HCl 0,1 M seguidos por 8 mL de água destilada, segundo SYDENHAM *et alii* (1996). As duplicatas foram feitas nas colunas regeneradas.

Para a preparação dos padrões derivados foram transferidos 100 µL das soluções de trabalho das fumonisinas B₁ e B₂ (50+50 µg/mL) para um frasco e adicionados 200 µL do reagente OPA (dissolver 40 mg de OPA em 1 mL de metanol, diluir com 5 mL de tampão tetraborato de sódio 0,1 M e adicionar 50 µL de 2-mercaptoetanol), segundo SHEPHARD *et alii* (1990). Foi agitado em ultra-som a 5-15°C durante 30 segundos, e injetados 20 µL após 60 segundos de reação. O reagente OPA foi acondicionado em frasco âmbar, coberto com papel alumínio e conservado por até 1 semana em temperatura de refrigeração.

Os extratos das amostras de milho foram redissolvidos em 500 µL de acetonitrila:água (1+1) e filtrados em filtros de 0,45 µm. Foram transferidos 100 µL deste extrato para um frasco, e adicionados 200 µL do reagente OPA. Foi agitado em ultra-som a 5-15°C durante 30 segundos, e injetados 20 µL após 60 segundos de reação. As

fumonisinias foram analisadas por um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, consistindo de uma bomba M-510 (Waters Associates, Milford, MA) com alça de injeção de 20 µL e um injetor tipo Rheodyne Inc M-7125 (Cotati, CA) conectado a um detector de fluorescência HP1046A e um integrador HP3393A (Hewlett Packard, Avondale, PA). As separações foram feitas em coluna (250 mm x 4,6 mm) Varian (Walnut Creek, CA) empacotada com Microsorb-MV 5 µm ODS de fase reversa, usando uma fase móvel composta por acetonitrila:água:ácido acético glacial (50+50+0,5) até 15 minutos, seguida por acetonitrila pura. O tempo total de análise foi de 30 minutos. Após a corrida foram necessários 30 minutos para condicionar a coluna com a fase móvel inicial, antes da próxima injeção. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 nm e 440 nm, respectivamente. A vazão foi de 1,0 mL/minuto.

A identificação dos compostos analisados foi realizada através da comparação dos tempos de retenção estabelecidos com as amostras e os padrões. A quantificação dos compostos foi o da padronização externa, utilizando-se as áreas dos picos. Os limites de detecção do método foram definidos para nossas condições de trabalho, como a concentração das fumonisinas B₁ e B₂ presente na amostra que originou a menor área que permitia visualização inequívoca do pico.

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

6. Análise estatística: os dados de fumonisinas dos oito cultivares comuns obtidos das amostras de dois anos (safras 94/95 e 97/98) em três locais (Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga), foram analisados conjuntamente, utilizando o modelo inteiramente casualizado. Para comparação de médias utilizou-se o teste de Tukey a 5%. Os dados foram analisados utilizando o programa de análise estatística – SANEST (ZONTA *et alii*, 1987).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Incidência de fumonisinas em milho cultivado em safras diferentes: as duas safras estudadas mostraram-se distintas entre si considerando-se a contaminação por fumonisinas. Os locais estudados também mostraram-se distintos entre si considerando-se a contaminação por FB₁. Todos os cultivares analisados continham fumonisinas B₁ (FB₁) e B₂ (FB₂). Na safra de 94/95 os níveis de FB₁ variaram de 0,36 µg/g a 3,43 µg/g (concentração média de 2,04 µg/g) e os níveis de FB₂ variaram de 0,06 µg/g a 1,47 µg/g (concentração média de 0,47 µg/g). A concentração total de fumonisinas variou de 0,60 µg/g a 4,90 µg/g, sendo a média da concentração total de 2,50 µg/g. A proporção FB₂/FB₁ variou de 0,08 a 0,88.

Na safra de 97/98 os níveis de fumonisinas foram maiores que os observados em 94/95, com FB₁ variando de 1,50 µg/g a 22,20 µg/g (concentração média de 5,56 µg/g) e FB₂ variando de 0,08 µg/g a 4,83 µg/g (concentração média de 1,69 µg/g). A concentração total de fumonisinas variou de 1,96 µg/g a 27,04 µg/g, sendo que a média da concentração total foi de 7,25 µg/g. A proporção FB₂/FB₁ variou de 0,04 a 0,54. As maiores médias de contaminação tanto de FB₁ como de FB₂ foram encontradas na Estação Experimental em Capão Bonito.

A incidência de FB₁ e FB₂ e o total de fumonisinas variaram significativamente ($p < 0,001$) entre anos, locais e entre cultivares. Todas as interações analisadas foram significativas ($p < 0,001$) mostrando que a incidência de fumonisinas é muito variável e complexa. Houve maior produção de FB₁ e FB₂ em 97/98 em todos os locais e em todos os cultivares, a exceção do CO 32, que foi o mais estável com menor sensibilidade à produção dessas toxinas.

Em Capão Bonito e Ribeirão Preto, a produção de fumonisinas foi sempre maior que em Votuporanga nas duas safras estudadas. Na média dos dois anos e em 97/98, a produção de fumonisinas em Capão Bonito foi maior do que em Ribeirão Preto. Ao nível de cultivar, observou-se maior diferenciação entre os cultivares quanto a FB₁, sendo o CO 42 o mais sensível à produção de FB₁ com nível médio $> 5,0$ µg/g.

Os resultados da análise de variância conjunta dos dados de fumonisinas estão apresentados na Tabela 16.

TABELA 16. Resultados da análise de variância conjunta dos dados de fumonisinas B₁ e B₂, das safras de 94/95 e 97/98, nas Estações Experimentais do Instituto Agrônomo em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga.

Causas de Variação	Graus de Liberdade (GL)	Quadrado Médio (QM)		
		FB ₁	FB ₂	FB ₁ + FB ₂
Ano	1	297,15 **	35,60 **	538,47 **
Local	2	41,22 **	1,41 **	47,67 **
Cultivar	7	28,19 **	0,41 *	34,93 **
Ano x Local	2	23,91 **	1,50 **	35,38 **
Ano x Cultivar	7	18,82 **	1,52 **	29,12 **
Local x Cultivar	14	21,54 **	1,79 **	35,13 **
Ano x Local x Cultivar	14	17,53 **	1,52 **	28,74 **
Resíduo	48	11,20	0,24	1,78
C. V. (%)		28,81	45,20	27,35

* Significativo a 5% pelo teste de F.

** Significativo a 1% pelo teste de F.

Os resultados da incidência de fumonisinas B₁ e B₂ nos cultivares de milho analisados estão apresentados na Tabela 17.

TABELA 17. Média de fumonisinas B₁ e B₂ em 8 cultivares de milho colhidos nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, nas safras de 94/95 e 97/98.

Genótipos	Capão Bonito				Ribeirão Preto				Votuporanga			
	94/95		97/98		94/95		97/98		94/95		97/98	
	FB ₁ µg/g	FB ₂ µg/g	FB ₁ µg/g	FB ₂ µg/g	FB ₁ µg/g	FB ₂ µg/g	FB ₁ µg/g	FB ₂ µg/g	FB ₁ µg/g	FB ₂ µg/g	FB ₁ µg/g	FB ₂ µg/g
AGN 2012	2,21	0,55	4,06	0,96	3,12	0,64	12,27	3,60	3,43	1,47	3,82	1,47
AL 34	2,39	0,55	3,96	1,44	2,27	0,17	3,00	1,20	2,22	0,62	7,64	4,11
Colorado 32	1,70	0,53	1,91	0,08	2,89	0,23	1,50	0,46	0,66	0,53	1,80	0,24
Colorado 42	2,57	0,35	22,20	4,83	2,76	0,28	5,33	1,03	0,73	0,06	4,35	1,52
Dina 766	2,25	0,72	11,33	3,05	3,29	0,30	5,61	1,12	0,74	0,23	2,24	0,86
P 3041	3,04	0,80	8,60	2,98	1,47	0,17	5,11	2,00	0,36	0,25	4,29	1,90
Zeneca 8392	1,68	0,38	7,52	1,99	2,48	0,36	2,38	0,73	3,24	1,27	3,74	0,97
Zeneca 8501	2,33	0,24	2,92	0,63	1,97	0,25	4,35	1,01	0,40	0,36	3,56	1,16
Média	2,27	0,52	7,81	2,00	2,53	0,30	4,93	1,39	1,47	0,60	3,93	1,53
Desvio Padrão	0,25	0,11	1,47	0,36	0,67	0,04	0,92	0,51	0,73	0,14	1,19	0,32
C. V. (%) *	15,91	26,47	19,35	26,55	28,14	18,02	25,52	56,59	68,93	35,85	32,90	40,42
dms * (Tukey a 5%)	1,34	0,54	5,98	2,10	2,82	0,22	5,00	3,12	4,02	0,84	5,12	2,69

Os resultados representam a média de duplicatas e foram corrigidos para a recuperação.

Limites de detecção: FB₁ = 0,02 µg/g e FB₂ = 0,04 µg/g.

* Dados obtidos na análise de variância individual dos experimentos.

A comparação dos resultados da incidência de fumonisinas em dois anos por região indica diferença de comportamento dos cultivares quanto ao acúmulo de fumonisinas.

Os cultivares AGN 2012 e Zeneca 8392 apresentaram as maiores médias de fumonisinas sem diferir dos demais, no entanto, na safra de 97/98 o cultivar mais contaminado foi o Colorado 42 para FB₁ e FB₂. Quando se analisa as duas safras não consecutivas observa-se que os cultivares Colorado 42 e AGN 2012 são os mais sensíveis ao acúmulo de fumonisinas, respectivamente para FB₁ e FB₂, nas Estações Experimentais estudadas, não sendo portanto indicado o seu plantio. Assim, fica evidenciada a necessidade de empregar mais de um ano agrícola para fazer inferências sobre a resistência dos cultivares de milho ao acúmulo de fumonisinas, bem como a validade da experimentação regional para caracterizar os genótipos mais adaptados e/ou resistentes em cada condição edafoclimática.

Quando se comparam cultivares plantados em duas safras não consecutivas, observa-se que o cultivar Colorado 32 apresentou maior estabilidade, não sofrendo interação com o meio ambiente. Foi o que menos acumulou fumonisinas (Tabela 18). O comportamento apresentado por este cultivar indica a possibilidade de seleção de cultivares menos sensíveis ao acúmulo de fumonisinas.

TABELA 18. Médias de fumonisinas de três locais (Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga) nas safras de 94/95 e 97/98, em oito cultivares de milho.

Genótipos	Safr		Média ($\mu\text{g/g}$)
	94/95	97/98	
	FB ₁ + FB ₂ ($\mu\text{g/g}$)	FB ₁ + FB ₂ ($\mu\text{g/g}$)	
AGN 2012	4,01	8,73	6,37
AL 34	2,74	5,99	4,37
Colorado 32	2,18	2,00	2,09
Colorado 42	2,25	13,09	7,67
Dina 766	2,51	8,07	5,29
P 3041	2,03	8,29	5,16
Zeneca 8392	3,13	5,78	4,45
Zeneca 8501	1,85	4,54	3,20
Média	2,59	7,06	
C. V. (%) *	57,46	57,46	57,46
dms * (Tukey a 5%)	5,08	5,08	3,59

Os resultados foram corrigidos para a recuperação.

Limites de detecção: FB₁ = 0,02 $\mu\text{g/g}$ e FB₂ = 0,04 $\mu\text{g/g}$.

* Dados obtidos da análise de variância conjunta.

Todas as amostras analisadas nas safras de 94/95 e 97/98 continham níveis de fumonisinas acima de 1,0 $\mu\text{g/g}$, sendo que 75% das amostras analisadas em 97/98 continham níveis superiores a 5,0 $\mu\text{g/g}$. O "Mycotoxin Committee of American Association of Veterinary Diagnosticians" (RILEY *et alii*, 1993) recomenda níveis máximos de 5,0 $\mu\text{g/g}$ de fumonisinas para ração de eqüinos, 10,0 $\mu\text{g/g}$ para ração de suínos, e 50,0 $\mu\text{g/g}$ para ração de bovinos e frangos de corte.

Os resultados observados para incidência de fumonisinas em duas safras são bastante elevados, indicando a necessidade de uma investigação maior quanto à contaminação por fumonisinas em milho, não só no Estado de São Paulo, mas como em todos os outros Estados produtores de milho no país. A necessidade de se investigar produtos derivados de milho para o consumo humano torna-se evidente tendo em vista que 13,5% do milho produzido se destina à indústria de alimentos (PEDROZA & DEZEN, 1991).

A distribuição de freqüência dos níveis de contaminação por fumonisinas nas amostras analisadas estão representadas pela Figura 26.

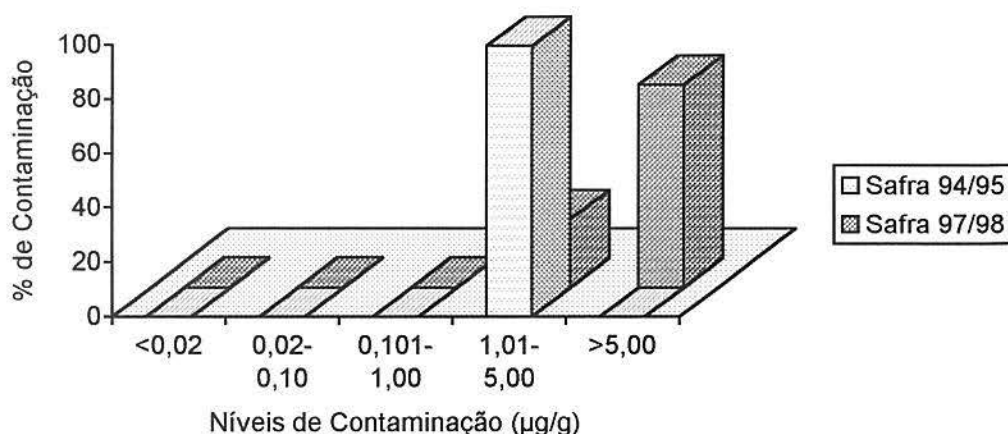


FIGURA 26. Distribuição de freqüência da contaminação por fumonisinas em oito cultivares de milho das Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, nas safras de 94/95 e 97/98.

Os níveis de fumonisinas encontrados nas amostras de milho analisadas nas safras de 94/95 e 97/98 estão entre os maiores do mundo, ocasionando um risco à saúde dos animais e principalmente dos humanos que utilizarem este milho em sua dieta.

2. Influência dos fatores climáticos na produção de fumonisinas: as diferenças nos níveis de contaminação por fumonisinas observadas nos cultivares plantados nas diferentes Estações Experimentais estudadas podem ser parcialmente atribuídas às

variações climáticas e condições ambientais apresentadas nos diferentes locais e safras. No entanto, não foi observada correlação entre temperaturas e contaminação por fumonisinas, entre as duas safras analisadas. As temperaturas observadas em todas as Estações Experimentais estudadas, foram maiores durante a safra de 97/98. As temperaturas máximas e mínimas observadas nas Estações Experimentais de Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, nas safras de 94/95 e 97/98 (Figuras 27 a 29).

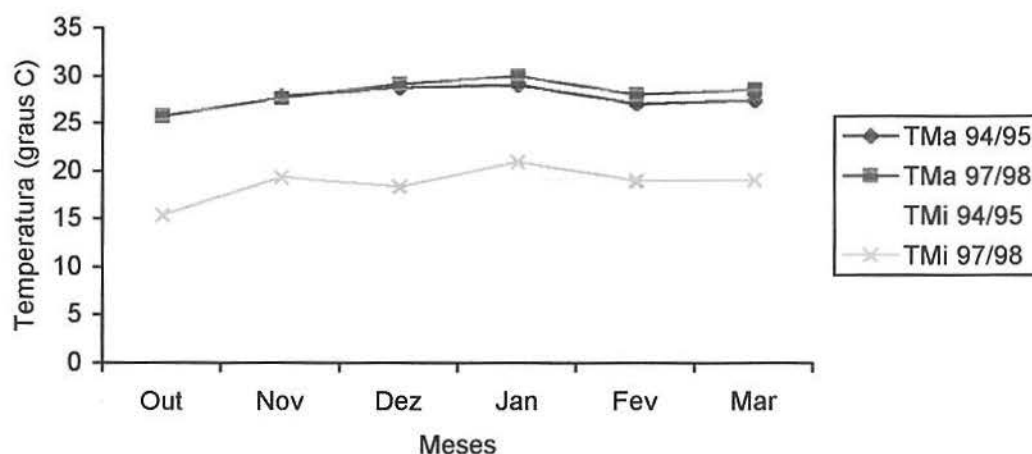


FIGURA 27. Temperaturas máximas (TMa) e temperaturas mínimas (TMi) do plantio à colheita na Estação Experimental do Instituto Agronômico em Capão Bonito, nas safras de 94/95 e 97/98.

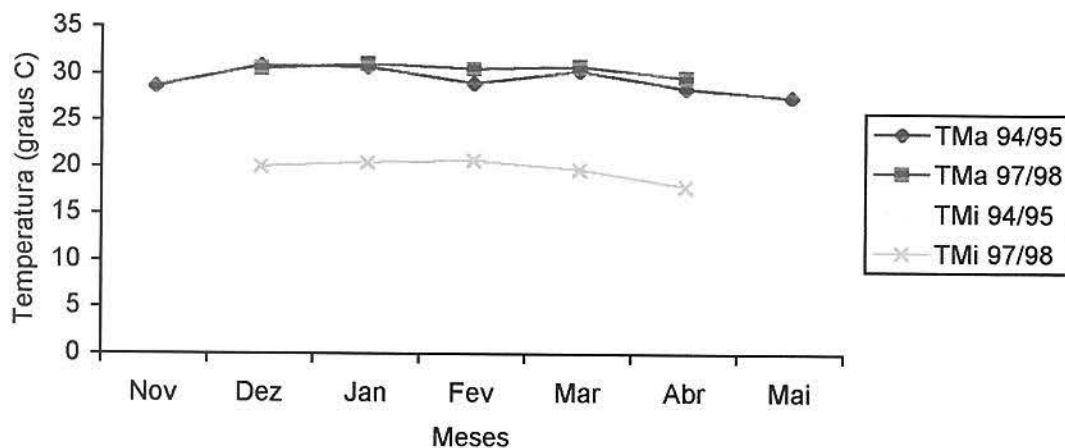


FIGURA 28. Temperaturas máximas (TMa) e temperaturas mínimas (TMi) do plantio à colheita na Estação Experimental do Instituto Agrônomo em Ribeirão Preto, nas safras de 94/95 e 97/98.

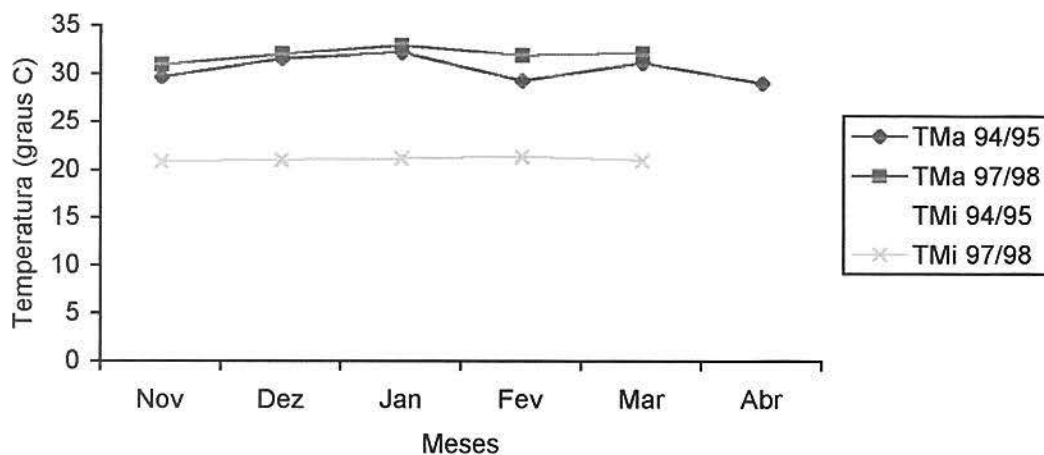


FIGURA 29. Temperaturas máximas (TMa) e temperaturas mínimas (TMi) do plantio à colheita na Estação Experimental do Instituto Agrônomo em Votuporanga, nas safras de 94/95 e 97/98.

A contaminação por fumonisinas em produtos agrícolas reflete a incidência da infecção fúngica nos grãos durante uma safra em particular, que é influenciada por vários fatores tais como origem, condições atmosféricas, e danos causados por insetos. Estes efeitos sazonais podem ser vistos pela comparação dos dados coletados durante as safras de

94/95 e 97/98. Os cultivares plantados durante a safra de 97/98 apresentaram os maiores níveis de contaminação que os cultivares plantados na safra anterior. Alguns autores sugerem que a quantidade elevada de esporos fúngicos presentes no ar durante o florescimento feminino é importante para determinar o grau de infecção do milho.

No presente trabalho foi possível observar que a quantidade de chuvas durante a safra de 94/95 nas Estações Experimentais estudadas foi bastante diferente do índice pluviométrico observado na safra de 97/98. Foi observada uma forte correlação ($r = -0,96$ e $-0,99$, respectivamente) entre índice pluviométrico e contaminação por fumonisinas nos cultivares analisados nas safras de 94/95 e 97/98 (CAMARGOS *et alii*, 2000 a, b). Devido ao número reduzido de cultivares analisados em comum nas duas safras não consecutivas, não foi possível observar correlação entre a contaminação por fumonisinas e o índice pluviométrico após o florescimento feminino. Os dados referentes aos índices pluviométricos (médias diárias/mensais) nas Estações Experimentais analisadas durante o período do plantio à colheita dos cultivares de milho durante as safras de 94/95 e 97/98 (Figuras 30 a 32).

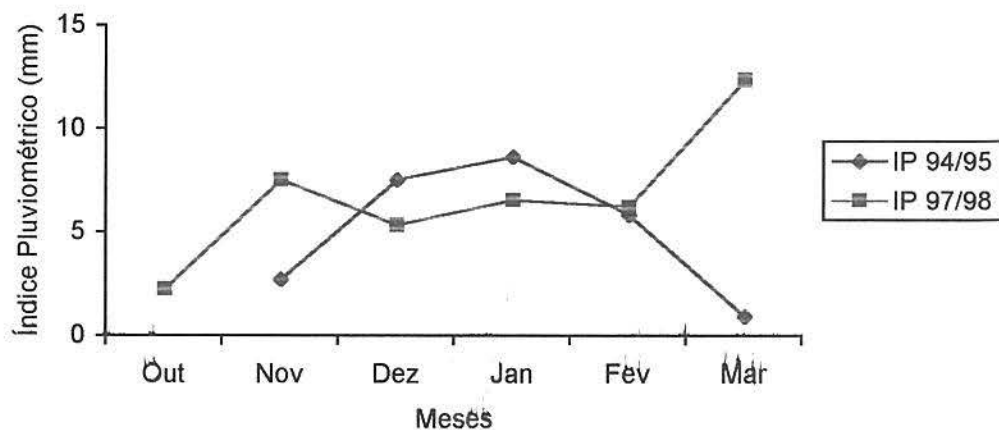


FIGURA 30. Índice Pluviométrico (IP) do plantio à colheita nas Estações Experimentais do Instituto Agrônomo em Capão Bonito, nas safras de 94/95 e 97/98.

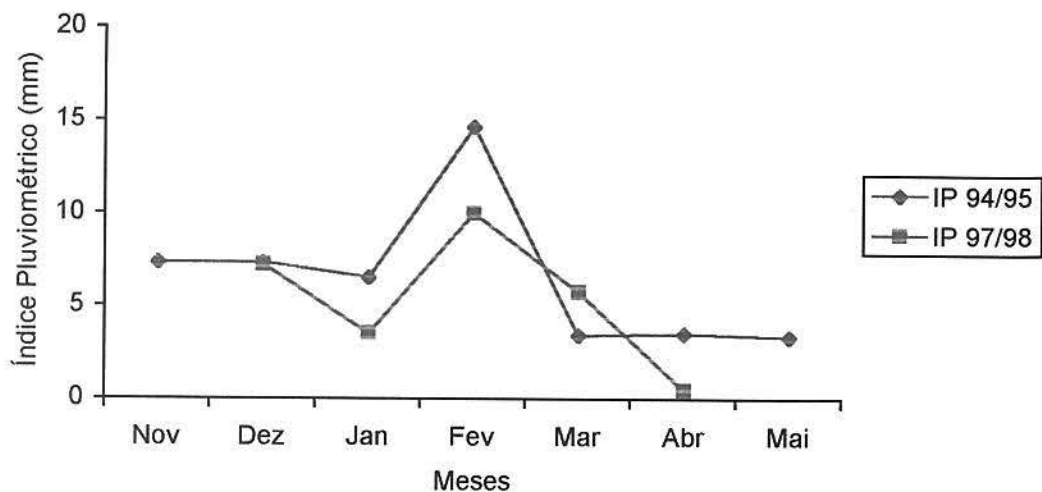


FIGURA 31. Índice Pluviométrico (IP) do plantio à colheita nas Estações Experimentais do Instituto Agronômico em Ribeirão Preto, nas safras de 94/95 e 97/98.

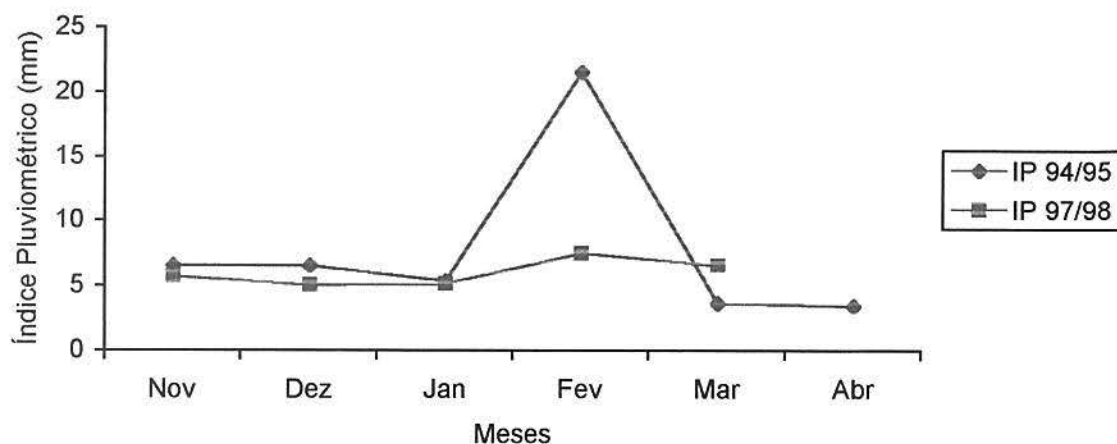


FIGURA 32. Índice Pluviométrico (IP) do plantio à colheita na Estação Experimental do Instituto Agronômico em Votuporanga, nas safras de 94/95 e 97/98.

Os dados de umidade relativa do ar foram coletados apenas na Estação Experimental do Instituto Agronômico em Ribeirão Preto, e os valores variaram de 74,4 a 83,2% na safra de 94/95 e de 72,2 a 81,4% na safra de 97/98. Apesar dos índices pluviométricos apresentarem perfis diferentes nas duas safras, com maior quantidade de chuvas na safra de 94/95, não houve diferença significativa na umidade relativa do ar

durante o período do plantio à colheita nas duas safras. Não foi possível verificar se há correlação entre contaminação por fumonisinas e umidade relativa do ar, pela falta de dados nas outras Estações Experimentais.

Os dados de umidade relativa do ar na Estação Experimental do Instituto Agronômico em Ribeirão Preto nas duas safras analisadas estão representados pela Figura 33.

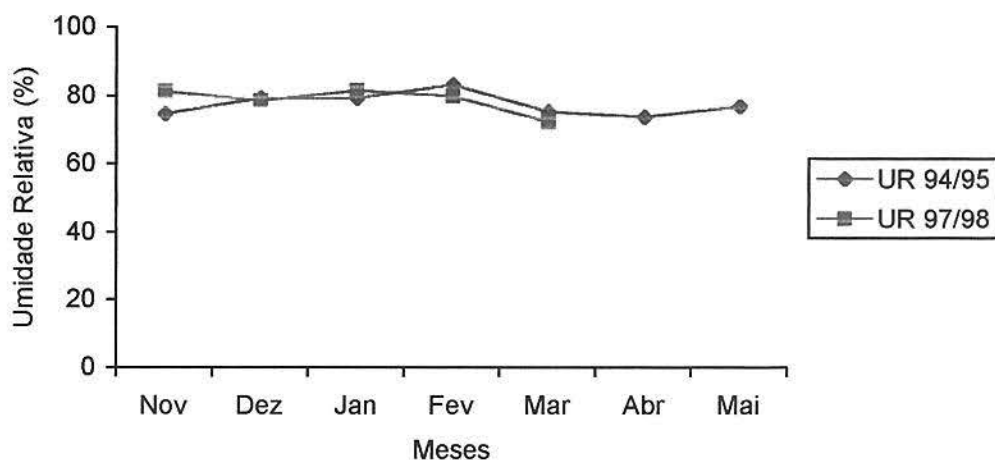


FIGURA 33. Umidade relativa do ar (UR) do plantio à colheita na Estação Experimental do Instituto Agronômico em Ribeirão Preto, nas safras de 94/95 e 97/98.

CONCLUSÕES

Os teores de fumonisinas encontrados nos cultivares de milho plantados em três regiões do Estado de São Paulo nas safras de 94/95 e 97/98 revelaram que 100% das amostras continham níveis de fumonisinas acima de 1,0 $\mu\text{g/g}$, nível este considerado suficientemente alto para causar preocupações para a saúde humana. Das amostras cultivadas na safra de 97/98, 75% continham níveis de contaminação acima de 5,0 $\mu\text{g/g}$, portanto acima do recomendado pelo "Mycotoxin Committee of American Association of Veterinary Diagnostician" para ração de equinos. Os resultados colocam o milho plantado no Estado de São Paulo dentre os mais contaminados do mundo com relação a fumonisinas.

Embora todos os cultivares analisados apresentassem contaminação por fumonisinas B₁ e B₂, pode-se concluir que as condições ambientais específicas (índice pluviométrico) de cada área de cultivo representaram um importante fator na formação das fumonisinas no milho. As diferenças nos níveis de fumonisinas encontradas em alguns cultivares em diferentes locais, sugerem a possibilidade da seleção de cultivares menos sensíveis ao *Fusarium* e ao acúmulo de fumonisinas, adaptados para cada local em particular. Em Votuporanga foram observados os menores níveis de contaminação com FB₁ nas duas safras estudadas. O CO 32 apresentou maior resistência à produção de fumonisinas.

Não foi observada nenhuma correlação entre temperatura ambiente e contaminação por fumonisinas.

A comparação dos resultados da incidência de fumonisinas em dois anos por região indica uma grande diferença de comportamento dos cultivares quanto ao acúmulo de fumonisinas. Fica então evidenciada a necessidade de empregar mais de um ano agrícola para que inferências possam ser feitas sobre a resistência dos cultivares de milho ao *Fusarium*, bem como a validade da experimentação regional para caracterizar os genótipos mais adaptados e/ou resistentes em cada condição edafoclimática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEZUIDENHOUT, S. C., GELDERBLOM, W. C. A., GORST-ALLMAN, C. P., HORAK, R. M., MARASAS, W. F. O., SPITELLER, G., VLEGGAAR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of Chemical Society and of Chemical Community**, p. 743-745, 1988.
- CAMARGOS, S. M., MACHINSKI JR, M., SOARES, L. M. V. Avaliação de métodos para determinação de fumonisinas B₁ e B₂ em milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 58, n. 2, 1999 (no prelo).
- CAMARGOS, S. M., VALENTE SOARES, L. M., SAWASAKI, E., BOLONHEZI, D., CASTRO, J. L., BORTOLETTO, N. Incidência de fumonisinas em cultivares de milho no Estado de São Paulo: Influência das características agronômicas e das condições climáticas na safra de 97/98. **Capítulo da tese de Doutorado em Ciência de Alimentos pela Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP**. 2000b.

- CAMARGOS, S. M., VALENTE SOARES, L. M., SAWASAKI, E., BOLONHEZI, D., SORDI, G., CASTRO, J. L., BORTOLETTO, N. Incidência de fumonisinas em cultivares de milho no Estado de São Paulo: Influência das características agronômicas e das condições climáticas na safra de 94/95. **Capítulo da tese de Doutorado em Ciência de Alimentos pela Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP**. 2000a.
- DAVIS, R. M., KEGEL, F. R., SILLS, W. M., FARRAR, J. J. *Fusarium* ear rot of corn. **Californian Agriculture**, v. 43, p. 4-5, 1989.
- DE LÉON, C., PANDEY, S. Improvement of resistance to ear and stalk rots and agronomic traits in tropical maize gene pools. **Crop Science**, Madison, v. 29, p. 12-17, 1989.
- DUARTE, A. P., PATERNIANI, M. E. A. G. S. Z. Avaliação de cultivares de milho no Estado de São Paulo. In: INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. **Cultivares de milho no Estado de São Paulo. Resultados das avaliações regionais IAC/CATI/EMPRESAS – 1997/98. Documentos IAC 62**. Campinas: IAC. 1998. p. 1-5.
- GELDERBLUM, W. C. A., JASKIEWICZ, K., MARASAS, W. F. O., THIEL, P. G., HORAK, R. M., VLEGGAAR, R., KRIEK, N. P. J. Fumonisins: novel mycotoxin with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁, in rats. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 12, n. 7, p. 1247-1251, July. 1988.
- GELDERBLUM, W. C. A., KRIEK, N. P. J., MARASAS, W. F. O., THIEL, P. G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁, in rats. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 12, n. 7, p. 1247-1251, July. 1991.
- HARRISON, L. R., COLVIN, B. M., GREENE, J. T., NEWMAN, L. E., COLE, J. R. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **Journal of Veterinary and Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 217-221, 1990.
- HEADRICK, J. M., PATAKY, J. K. Resistance to kernel infection by *Fusarium moniliforme* in inbred lines of sweet corn and the effect of infection on emergence. **Plant Disease**, St. Paul, v. 73, p. 887-892, 1989.
- 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 milhos. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICOTOXINAS, 1 – ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 8, Rio de Janeiro, 1994. **Resumo...** 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**, London, v. 13, n. 2, p. 173-183, Feb/Mar. 1996.

- KELLERMAN, T. S., MARASAS, W. F. O., THIEL, P. G., GELDERBLUM, W. C. A., CAWOOD, M. E., COETZER, J. A. W. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B₁. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, v. 57, p. 269-275, 1990.
- LEW, H., ADLER, A., EDINGER, W. Moniliformin and the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). **Mycotoxin Research**, Mainz, v. 7, p. 71-76, 1991.
- LILLEHOJ, E. B., ZUBER, M. S. Distribution of toxin-producing fungi in nature maize kernels from diverse environments. **Tropical Science**, Oxford, v. 28, p. 19-24, 1988.
- 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 Africa of Medical Journal**, Pretoria, v. 74, p. 110-114, 1988.
- MEIRELES, M. C. A., CORRÊA, B., FISCHMAN, O., GAMBALE, W., PAULA, C. R., FONSECA, H. Leucoencefalomácia equina (LEME) no Brasil. II. Aspectos microbiológicos e micotoxicológicos dos surtos ocorridos nos anos de 1988 a 1990. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 7, São Paulo, 1992. **Resumo...** p. 18.
- MEREGE, W. H., SAWASAKI, E., DUARTE, A. P. Milho. Resultados dos testes regionais de competição de cultivares comerciais, safra 94/95 – plantio de verão. **Documento Técnico CATI**, Campinas, n.99, jan. 1996. 34 p.
- PEDROSA, A. V. B., DEZEN, R. B. O milho: características do mercado e perspectivas. **Preços Agrícolas**, v. 55, p. 1-4, 1991.
- PITTET, A., PARISOD, V., SCHELLENBERG, M. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn-based products from the Swiss market. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, p. 1352-1354, 1992.
- RHEEDER, J. P., MARASAS, W. F. O., THIEL, P. G., SYDENHAM, E. W., SHEPHARD, G. S., van SCHALKWYK, D. J. *Fusarium moniliforme* and the fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, St. Paul, v. 82, p. 129-135, 1992.
- RHEEDER, J. P., SYDENHAM, E. W., MARASAS, W. F. O., THIEL, P. G., SHEPHARD, G. S., SCHLECHTER, M., STOKENSTRÖM, S., CRONJE, D. W., VILJOEN, J. H. Ear rot fungi and mycotoxins in South Africa corn of the 1989 crop exported to Taiwan. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 127, p. 35-41, 1994.
- RHEEDER, J. P., SYDENHAM, E. W., MARASAS, W. F. O., THIEL, P. G., SHEPHARD, G. S., SCHLECHTER, M., STOCKENSTRÖM, S., CRONJE, D. W., VILJOEN, J. H. Fungal infestation and mycotoxin contamination of South African commercial maize harvested in 1989 and 1990. **Suid-Afrikaanse Tydskrif vir Wetenskap**, v. 91, p. 127-131, Mar. 1995.

- ROSS, P. F., RICE, L. G., OSWEILER, G. D., NELSON, P. E., RICHARD, J. L., WILSON, T. M., RILEY, R. T. A review and update of animal toxicoses associated with fumonisin-contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, n. 1-2, p. 109-114, Feb. 1992.
- ROSS, P. F., RICE, L. G., PLATTNER, R. D., OSWEILER, G. D., WILSON, T. M., OWENS, D. L., NELSON, H. A., RICHARD, J. L. Concentrations of fumonisin B₁ in feeds associated with animal health problems. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 114, p. 129-135, 1991.
- RILEY, R. T., NORRED, W. P., BACON, C. W. Fungal toxins in foods: recent concerns. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 13, p. 167-189, 1993.
- SALGADO, J. M., CARVALHO, P. C. T. Fungos toxigênicos associados a cereais. I – Levantamento da microbiota do milho, trigo e arroz. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 11, p. 60-63, 1980.
- SHEPHARD, G. S., SYDENHAM, E. W., THIEL, P. G., GELDERBLUM, W. C. A. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, New York, v. 13, n. 10, p. 2077-2087, Oct. 1990.
- STYER, R. C., CANTLIFFE, D. J. Infection of two endosperm mutants of sweet corn by *Fusarium moniliforme* and its effect on seedling vigor. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, p. 189-194, 1984.
- SYDENHAM, E. W., MARASAS, W. F. O., SHEPHARD, G. S., THIEL, P. G., HIROOKA, E. Y. Fumonisin concentrations in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, n. 6, p. 994-997, June. 1992.
- SYDENHAM, E. W., SHEPHARD, G. S., THIEL, P. G., MARASAS, W. F. O., RHEDEER, J. P., PERALTA-SANHUEZA, C. E., GONZÁLEZ, H. H. L., RESNIK, S. L. Fumonisin in Argentinian field-trial corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 41, n. 6, p. 891-895, June. 1993.
- SYDENHAM, E. W., SHEPHARD, G. S., THIEL, P. G., MARASAS, W. F. O., STOCKENSTRÖM, S. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, n. 11, p. 2014-2018, Nov. 1991.

- 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, v. 79, n. 3, p. 688-696, May/June. 1996.
- THIEL, P. G., MARASAS, W. F. O., SYDENHAM, E. W., SHEPHARD, G. S., GELDERBLUM, W. C. A., RILEY, R. T., RICHARD, J. L. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 117, n. 1-2, p. 3-9, Feb. 1992.
- VISCONTI, A., DOKO, M. B., BOTTALICO, C., SCHURER, B., BOENKE, A. Stability of fumonisins (FB₁ and FB₂) in solution. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 11, p. 427-431, 1994.
- WENTZ, I., SILVEIRA, P. R. S., SOBESTIANSKY, J., SANTOS, C. R. M., REES, U. Fusariotóxicos e estrogénismo em suínos. **Comunicação Técnica CNPSA/EMBRAPA**, v. 24, p. 1-3, ago. 1981.
- YAMAGUSHI, M. M., HIROOKA, E. Y., SHIBATA, T. M. M., HASSEGAWA, R. H., AOYAMA, S., SUGIURA, T., UENO, Y. Fumonisinas em milho no Estado do Paraná. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 7, São Paulo, 1992. **Resumo...** p. 27.
- ZHEN, Y. Z. The culture and isolation of fungi from the cereals in five high and three low incidence counties of esophageal cancer in Henan Province. **Journal of Chinese Tumor**, v. 6, p. 27-29, 1984.
- ZONTA, E. P., MACHADO, A. A., SILVEIRA JUNIOR, P. **Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Manual de Utilização: Pelotas, 1987.

CONCLUSÕES

A avaliação de métodos para a determinação de fumonisinas em milho conduzida durante o presente trabalho indicou o método da AOAC Internacional, com algumas modificações, como mais adequado. Os limites de detecção foram de 20 ng/g para FB₁ e de 40 ng/g para FB₂ e a recuperação foi de 93-96% para FB₁ e de 69-85% para FB₂. A repetibilidade do método para a mesma amostra analisada em dias diferentes expressa pelo desvio padrão entre duplicatas foi de 0,6% para FB₁ e de 2,2% para FB₂.

Os teores de fumonisinas encontrados em 35 cultivares de milho plantados em três diferentes regiões do Estado de São Paulo na safra de 94/95 e em 52 cultivares na safra de 97/98, revelaram que 76,2% e 67% respectivamente, estavam com contaminação acima de 1,0 µg/g, nível este considerado suficientemente alto para causar preocupações para a saúde humana. Sendo que, 7,6% e 42,7% respectivamente, estavam acima de 5,0 µg/g, portanto acima do recomendado pelo "Mycotoxin Committee of American Association of Veterinary Diagnostician" para ração de equinos. Os resultados colocam o milho plantado no Estado de São Paulo dentre os mais contaminados do mundo.

Embora todos os cultivares analisados apresentassem contaminação por fumonisinas B₁ e B₂, pode-se concluir que as condições ambientais (índice pluviométrico) específicas de cada área de cultivo representaram um importante fator na formação das fumonisinas no milho. As diferenças nos níveis de fumonisinas encontradas em alguns cultivares em diferentes locais, sugerem a possibilidade da seleção de cultivares menos sensíveis ao *Fusarium* e ao acúmulo de fumonisinas adaptados para cada local em particular. No entanto nenhum dos cultivares apresentou resistência à produção de fumonisinas.

Não foi observada nenhuma correlação entre contaminação com fumonisinas e tipo de germoplasma, de endosperma e duração do ciclo vegetativo nos cultivares analisados nas safras de 94/95 e 97/98.

Foi observada diferença significativa entre as temperaturas mínimas registradas nas Estações Experimentais analisadas durante as safras de 94/95 e 97/98, no entanto, não foi observada nenhuma correlação entre temperatura ambiente e contaminação com fumonisinas.

Foi observada correlação negativa ($r = -0,96$ e $-0,99$, respectivamente) entre índice pluviométrico após o florescimento feminino e contaminação com fumonisinas nas safras de 94/95 e 97/98. Chuvas reduzidas após o florescimento feminino apresentaram-se como um fator importante para a produção de fumonisinas nos cultivares.

A comparação dos resultados da incidência de fumonisinas em dois anos por região indica uma grande diferença de comportamento dos cultivares quanto ao acúmulo de fumonisinas. Tais resultados ficaram aparentes apenas quando os mesmos cultivares foram testados por dois anos agrícolas. Estes resultados evidenciam a necessidade do emprego de mais de um ano agrícola para fazer inferências sobre a resistência dos cultivares de milho à produção de fumonisinas, bem como a validade da experimentação regional para caracterizar os genótipos mais adaptados e/ou mais resistentes em cada condição edafoclimática.

