

**CONTAMINAÇÃO ENDÓGENA POR *Aspergillus* spp. E SEUS
TELEOMORFOS COM POTENCIAL TOXÍGENO EM MILHO PÓS-
COLHEITA DO ESTADO DO PARANÁ**

ANTONIO XAVIER DE FARIAS

*Tese submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de "Magister
Scientiae" em Microbiologia Veterinária.*

1996

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA

CONTAMINAÇÃO ENDÓGENA POR *Aspergillus* spp. E SEUS
TELEOMORFOS COM POTENCIAL TOXÍGENO EM MILHO PÓS-
COLHEITA DO ESTADO DO PARANÁ

AUTOR: ANTONIO XAVIER DE FARIAS

ORIENTADOR: PROF. CHARLES FREDERICK ROBBS

Tese submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de "Magister
Scientiae" em Microbiologia Veterinária.

SEROPÉDICA - RJ

Novembro/1996.

635.6793
F2274c
T

TÍTULO DA TESE

CONTAMINAÇÃO ENDÓGENA POR *Aspergillus* spp. E SEUS
TELEOMORFOS COM POTENCIAL TOXÍGENO EM MILHO PÓS-
COLHEITA DO ESTADO DO PARANÁ

AUTOR

ANTONIO XAVIER DE FARIAS

APROVADA EM 10 DE DEZEMBRO 1996

PROF. CHARLES FREDERICK ROBBS

PROF. SÉRGIO GASPAR DE CAMPOS

PROF. LUIZ CELSO HYGINO DA CRUZ

*Entre desejar e esperar, melhor é fazer, e a senda
única indicada a todos aqueles que realizam algo de
útil, a benefício do próximo, será sempre servir
ampliando o trabalho e trabalhar sempre para
melhor servir.*

F.C. XAVIER.

AGRADECIMENTOS

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-CTAA) pela
sponsandade na realização deste treinamento.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária,
Depto. de Microbiologia e Imunologia Veterinária, por conceder a oportunidade de
realização do curso de pós-graduação em Microbiologia Veterinária.

**Aqueles que me proporcionaram a vida,
Gerson e Silvia.**

As Pessoas S. S. Cordeiro, S. S. Cordeiro, como
Chefe e responsável de área do CTAA, respectivamente, pela confiança e
depoimento e apoio oferecido na decorrer deste trabalho.

Ao Professor Dr. Charles Frederick Robbs, pela valiosa orientação, pelo
constante incentivo, apoio, dedicação e exemplo.

**E, aos meus dois amores,
Lili e Luizinho**

Ao Coordenador do Curso de Pós-graduação em Microbiologia Veterinária,
Professor, Luiz Celso Hygino da Cruz.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-CTAA) pela oportunidade de realização deste treinamento.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária, Depto. de Microbiologia e Imunologia Veterinária, por conceder a oportunidade de realização do curso de pós-graduação em Microbiologia Veterinária.

Às Pesquisadoras Hilda da Rosa Rodrigues e Tânia B.S. Corrêa, como Chefe e responsável de área do CTAA, respectivamente, pela confiança a mim depositada e apoio oferecido no decorrer deste trabalho.

Ao Professor Dr. Charles Frederick Robbs, pela valiosa orientação, pelo constante incentivo, apoio, dedicação e exemplo de vida dedicada a pesquisa.

Ao Coordenador do Curso de Pós-graduação em Microbiologia Veterinária Professor. Luiz Celso Hygino da Cruz.

Aos Professores da UFRRJ Paschoal Guimarães Robbs, Sérgio Gaspar de Campos, Ronald Bastos Freire e Fujio Akiba pelos ensinamentos, esclarecimentos e sugestões.

À Equipe do Laboratório de Microbiologia/Microscopia do CTAA Anna M. Bittencourt, Fátima Borges, Luís Antônio G. Martins, Marco A.J. Carvalho, Regina Siqueira, Otniel Freitas e Paul M. Andersen, pela convivência, apoio e sugestões concedidas.

Aos amigos André L.B. Alvarenga e Marcelo E. Fraga pelo apoio, amizade e contribuição na realização deste trabalho.

Aos funcionários do CTAA Beatriz R. R. Affonso, Marcelo Bastos e Daíse Lopes pelas facilidades na execução das análises micotoxicológicas.

Aos colegas de pós-graduação Liliane R. Bittencourt e Mario J. de A. Gatti, e a funcionária Joselita pelos serviços prestados, amizade e estímulo.

À ABIMILHO, pela cessão das amostras de milho.

A todos que de alguma forma tenham contribuído para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Antonio Xavier de Farias, filho de Gerson Vieira de Farias e Silvia Xavier de Farias, nasceu na cidade do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro, em 22 de Julho de 1954.

Em Setembro de 1977 iniciou suas atividades profissionais como Analista de laboratório em microbiologia de alimentos na indústria BHERING S.A. Concomitantemente ingressou na PESAGRO-RJ em outubro de 1978 na função de Técnico de Laboratório I, permanecendo até maio de 1978 quando ingressou na EMBRAPA-CTAA, na função de Técnico de Laboratório II.

Graduou-se em Ciências Biológicas pela Fundação Técnico-Educacional Souza Marques, Rio de Janeiro, em dezembro 1985.

Em dezembro de 1989 foi reenquadrado como Pesquisador I, na área de microbiologia industrial (controle de qualidade e biotecnologia).

Iniciou o curso de mestrado em Microbiologia Veterinária em março de 1994 na UFRRJ, no departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária.

SUMÁRIO	página
AGRADECIMENTOS	vi
BIOGRAFIA	viii
SUMÁRIO	ix
ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1. Fungos: Natureza geral e importância	05
2.2. Microbiota fúngica	06
2.3. Micotoxinas	17
2.3.1. Aflatoxinas	18
2.3.2. Esterigmatocistina	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Local da pesquisa	20
3.2. Amostras analisadas	20
3.3. Determinação da umidade	22
3.4. Determinação da Atividade de água	23
3.5. Exteriorização dos fungos nos grãos	23
3.6. Isolamento dos fungos desenvolvidos	23
3.7. Identificação dos fungos do gênero <i>Aspergillus</i> e seus teleomorfos	24
3.8. Avaliação do potencial toxígeno dos fungos selecionados	25
3.8.1. <i>Aspergillus flavus</i> e <i>A. parasiticus</i>	25
3.8.2. <i>Eurotium amstelodami</i> e <i>E. chevalieri</i>	26
4. Resultados e discussão	28
5. Conclusões	39

6. Referências bibliográficas

TABELAS E FIGURAS

página

41

Tabela de Tabela

1. Tabela 1: Frequência de contaminação de milho analisadas	21
2. Tabela 2: Valores de umidade de água máxima (A _m) para o desenvolvimento de <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium</i> em algumas espécies de milho	22

Tabela de Figura

1. Figura 1: Mapa do Estado de Mato Grosso do Sul	23
2. Figura 2: Valores de umidade de água máxima (A _m) para o desenvolvimento de <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium</i> em algumas espécies de milho	24
3. Figura 3: Faixa de contaminação de milho pós-colheita no Estado de Mato Grosso do Sul	25
4. Figura 4: Espécies de <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium</i> isoladas e identificadas	26
5. Figura 5: Potencial biológico das espécies <i>A. flavus</i> e <i>A. parasiticus</i>	27

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

página

Índice de Tabelas

1. Tabela 1: Procedência das amostras de milho analisadas	21
2. Tabela 2: Valores de atividade de água mínima (Aa) para o desenvolvimento e produção de micotoxinas de algumas espécies fúngicas	32

Índice de Figuras

1. Figura 1: Teor de umidade das amostras analisadas	29
2. Figura 2: Valores de atividade de água das amostras analisadas	31
3. Figura 3: Faixas de contaminação fúngica em milho pós-colheita no Estado do Paraná	33
4. Figura 4: Espécies de <i>Aspergillus</i> e teleomorfos isolados e identificados	35
5. Figura 5: Potencial toxígeno das espécies <i>A.flavus</i> e <i>A.parasiticus</i>	36

RESUMO

Sessenta amostras de grãos de milho pós-colheita, provenientes de três regiões do Estado do Paraná, Brasil, foram avaliadas quanto ao conteúdo de umidade, contaminação fúngica, potencial toxígeno de algumas espécies de *Aspergillus* e seus teleomorfos (fase sexual). A umidade foi determinada por desidratação dos grãos e a atividade aquosa em equipamento Novasina®. Para o estudo da microbiota fúngica, foram selecionados 40 grãos, aparentemente sadios, desinfestados em NaClO incubados em câmara úmida para exteriorização dos fungos. As espécies fúngicas desenvolvidas foram isoladas e purificadas em ágar Czapek-Dox. As espécies *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Eurotium amstelodami* e *E. chevalieri* foram identificadas. O potencial toxígeno das espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, foi analisado por inoculação em meio ágar coco e a detecção dos metabólitos em cromatografia de camada delgada (CCD). *Eurotium* spp. foram avaliados quanto a síntese de seus metabólitos, em meio ágar Amendoim e em trigo triturado. A CCD e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram

utilizadas para detecção de esterigmatocistina. O conteúdo de umidade, nos grãos, situou-se em níveis desfavoráveis ao desenvolvimento fúngico. A percentagem de grãos contaminados variou entre 5 e 100%, prevalecendo os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. O *A.flavus* foi a espécie predominante (64%), seguido por *E. amstelodami* (19%), *E.chevalieri* (10%) e *A. parasiticus* (7%). Em 73 isolados de *A. flavus*, a síntese de aflatoxinas (afs) B1 e B2 foi evidenciada; 20 produziram B1; sete B1 e G1; três B1, B2, G1 e em seis não foi detectada (afs) B1, B2, G1 e G2. Todos os *A.parasiticus* produziram B1, B2, G1 e G2. Não foi detectada a síntese de esterigmatocistina pelas espécies *E.amstelodami* e *E.chevalieri*.

ABSTRACT

Sixty post-harvested maize kernels samples from three regions of the state of Paraná, Brazil, were evaluated to detect moisture content, fungi contamination and toxigenic potential of *Aspergillus* spp and some of their teleomorphs (sexual phase). The moisture content and water activity were determined through dehydration process of the kernels and by Novasina® equipment, respectively. To study fungi microbiota, 40 apparently healthy kernels were selected, and disinfected in NaClO incubated in moist chamber and plated in BOD for fungal exteriorization. Fungi species were isolated and cultivated in Czapek-Dox agar plates to obtain pure cultures. The species *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Eurotium amstelodami* and *E. chevalieri* were identified. The toxigenic potential of *Aspergillus* species were analyzed in coconut agar medium and the metabolic products were detected by thin layer chromatography (TLC). *Eurotium* spp. were evaluated for their metabolics by the growth in Peanut agar medium and in wheat grits. High performance liquid chromatography (HPLC) and TLC were

used to detect sterigmatocystin. Moisture content levels registered were not the ideal for fungi development. The kernel contamination varied from 5 to 100% and the prevalent genera detected were *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*, respectively. *A.flavus* was the predominant specie (64%), followed by *E.amstelodami* (19%), *E.chevalieri* (10%) and *A.parasiticus* (7%). Seventy three isolates of *A.flavus* produced aflatoxins (afs) B1 and B2; Twenty produced B1; seven produced B1 and G1; three produced B1, B2, G1 and B1, B2, G1 and G2 were not detected in six of the fungi isolates. All *A.parasiticus* produced B1, B2, G1 and G2. Sterigmatocystin synthesis was not detected in any condition by *E.amstelodami* and *E.chevalieri*.

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta anual monocotiledônea, pertencente à família Gramineae (Poaceae), tribo Maydeae e ao gênero *Zea*. A planta apresenta frutificação em espigas nas quais estão inseridos os grãos ou sementes. O fruto é do tipo cariopse e apresenta uma coloração variável (GOODMAN & SMITH, 1987).

Este cereal é bastante consumido em todo o mundo, tratando-se de um grão dotado de excelente fonte de energia metabolizável, pois o seu alto conteúdo em amido, apresenta-se em uma forma altamente digerível. É de ótima aceitação no consumo por humanos e animais "in natura", além de ser utilizado em vários processos industriais (TOSELLO, 1987; POLLAK & WHITE, 1995).

Cerca de 85% do milho produzido nos países desenvolvidos é utilizado para alimentação animal, sendo 10% para consumo humano direto e apenas 5% para uso industrial. Entretanto, os países em desenvolvimento utilizam até 75% de sua produção diretamente para alimentação humana.

A cultura do milho, na agricultura brasileira é considerada de grande importância econômica, sendo prioritária na política agrícola do país, por ser responsável pela maior utilização de mão-de-obra no setor rural. Ocupa a maior área cultivada, com ampla distribuição de norte a sul do país (KIBUUKA, 1993; POZZI, 1993) representando 43% da produção nacional de grãos. As regiões sul e sudeste são as responsáveis por 80% desta produção. O Estado do Paraná, participa com 22% deste total, sendo que 3,6 e 1,35 milhões de toneladas/ano são destinadas à produção de ração animal e alimentação humana, respectivamente (DALLAQUA, 1996).

Este cereal pode estar sujeito a contaminação por uma microbiota fúngica diversa durante o cultivo, a colheita, o armazenamento e o transporte, sendo responsável pela redução da qualidade sanitária, física e nutricional dos grãos e seus derivados, ocasionando elevadas perdas do produto além de, em condições favoráveis, produzir toxinas ocasionando problemas de saúde pública e animal. (LÁZZARI, 1993).

A atenção mundial para as micotoxinas, conjunto complexo de compostos tóxicos produzidos por certos fungos e que diferenciam-se das toxinas bacterianas por não serem de natureza protéica nem imunogênicas, foi despertada após uma

série de relatos entre 1960-1963 que denunciavam a morte de centenas de perus na Inglaterra e de patos em Uganda, uma semana após terem apresentado os primeiros sintomas de perda de apetite, diminuição da mobilidade, fraqueza das asas e das pernas. As necropsias demonstraram sempre lesões necróticas no fígado e congestão dos rins, bem como proliferação dos ductos biliares. Essa mortalidade, após várias suposições, foi finalmente relacionada a uma intoxicação causada pelas rações utilizadas pelos animais, que continham torta de amendoim altamente colonizada por *Aspergillus flavus*. A toxina isolada deste fungo, que reproduziu intoxicação semelhante nos animais estudados, foi identificada e denominada aflatoxina.

As aflatoxinas (AFs) são substâncias quimicamente conhecidas como bisfuranocumarinas produzidas principalmente por *A.flavus* e *A.parasiticus*. Várias substâncias são conhecidas no grupo das aflatoxinas, porém as mais encontradas em diversos produtos agrícolas e seus derivados são as B1, B2, G1 e G2, sendo a B1 a mais tóxica. Estes metabólitos têm ocasionado grande preocupação mundial devido aos prejuízos causados à saúde animal e humana (VALLADARES, 1985).

A esterigmatocistina, é um metabólito precursor na síntese das AF B1, e está incluída no grupo das substâncias caracterizadas por possuir um anel dehidrofurobensofurano acoplado a uma xantona. Esta micotoxina que possui atividades mutagênica e carcinogênica expressivas, é produzida principalmente por *A.versicolor* e alguns fungos xerofílicos (MILLS & ABRAMSON, 1986).

Considerando o exposto acima, constituíram-se os objetivos deste trabalho:

- a) Determinar o nível de contaminação endógena pelos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*;
- b) isolar e identificar os fungos do gênero *Aspergillus* e seus teleomorfos com potencial para síntese de aflatoxinas (B1, B2, G1, G2), e esterigmatocistina, presentes na microbiota de grãos milho pós-colheita produzido no Estado do Paraná;
- c) determinar o conteúdo de umidade (teor de umidade e a atividade de água) nos grãos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fungos: Natureza geral e importância

Os fungos são seres vivos eucarióticos, uni ou pluricelulares, aclorofilados, possuindo parede celular composta de polímeros de quitina e/ou de celulose e de subunidades compostas, principalmente, de N-acetilglucosamina. A parede celular fúngica pode apresentar também glucogênio ou galactose. Os fungos são na sua grande maioria heterotróficos, nutrindo-se de matéria orgânica morta (saprófitas) ou viva (parasitas). Diferenciam-se dos demais seres vivos por apresentarem duas características básicas: estrutura somática representada por hifa e fase dicariótica prolongada com presença de dois núcleos haplóides, sexualmente opostos. Estes microrganismos reproduzem-se, principalmente, por meio de esporos, podendo, também multiplicar-se por meio de fragmentação das

hifas. Alguns fungos apresentam em seu ciclo vital dois estágios: o anamorfo ou assexual, em que as estruturas reprodutivas acham-se livres e o teleomorfo com estruturas endógenas, em ascas e ascocarpos. Encontrados em quase todos os ecossistemas existentes da Terra, são capazes de decompor material orgânico com facilidade e produzir elevado número de esporos, que podem ser facilmente disseminados pelo vento, chuva, animal ou homem. A maioria dos fungos sobrevive mediante a produção e a secreção de enzimas para o ambiente que os rodeia, as quais degradam grande quantidade de substratos orgânicos e produzem nutrientes solúveis, que são absorvidos passivamente ou, então, levados para o interior da célula por intermédio de sistemas de transporte ativo. Aproximadamente 100.000 espécies de fungos foram descritas até o momento, e a cada ano novos fungos são descobertos (MUCHOVEJ & MUCHOVEJ, 1989 ; HAWKSWORTH, *et al.*, 1995; LUCAS *et al.*, 1992; BELÉM, 1994; KRUGNER & BACCHI, 1995).

2.2. Microbiota fúngica em grãos

Embora o Brasil seja o terceiro produtor Mundial de milho, com uma safra em torno de 27,1 milhões de toneladas em 1991/92 (Prognóstico Agrícola 1993/94), e apesar de ser o produto mais citado na literatura, depois do amendoim, quanto a ocorrência de micotoxinas, ainda existem poucas informações sobre a ocorrência de fungos produtores de toxinas neste produto. Os fungos de maior incidência em milho são: *Aspergillus halophilicus*, *A.restrictus*, *A.glaucus*, *A.candidus*, *A.ochraceus*, *A.flavus*, *A.parasiticus*, e algumas espécies de *Penicillium* e *Fusarium*. Segundo LÁZZARI (1993), estes fungos podem ser

divididos em três grupos: fungos de campo, intermediários e de armazenamento. Esta divisão não é taxonômica, e sim baseada em requisitos ecológicos.

PUZZI (1986) classifica os fungos que atacam os grãos em dois grupos: fungos de campo e fungos de depósitos, e postula que podem ser encontrados fungos de campo desenvolvendo-se em depósitos.

A identificação dessas espécies fúngicas é, de acordo com POZZI (1993), um importante sinalizador das micotoxinas presentes nos substratos, e indica este caminho para prevenir a sua produção. Considera ainda recomendável a identificação da microbiota fúngica dominante de grãos de milho em diferentes regiões do Brasil. Entretanto, RANJAN & SINHA (1991) afirmam que o isolamento e a identificação desses fungos nem sempre estão ligados à detecção de micotoxinas no produto analisado, considerando que existem cepas dentro de uma mesma espécie que não possuem a capacidade para síntese de micotoxinas. Sugere, portanto, a necessidade de se avaliar o potencial de biossíntese de metabólitos tóxicos por estes fungos.

A colonização e o metabolismo microbiano exigem a presença de água numa forma disponível. A atividade de água (Aa) é um índice desta disponibilidade para utilização em reações metabólicas e desenvolvimento dos microrganismos. Os fungos do gênero *Aspergillus* (*A.halophilicus*, *A.restrictus*, *A.glaucus*, *A.candidus*, *A.ochraceus*, *A.flavus* e *A.parasiticus*), são espécies capazes de se

desenvolverem em substratos com teores de umidade entre 13,0 e 20,0%. Desse modo, o controle da umidade é fundamental para o desenvolvimento destas espécies fúngicas. Estes microrganismos exercem um importante papel na qualidade dos grãos e sementes, podendo interferir na redução do índice de germinação e vigor, provocar descoloração, quebra e, em algumas situações auto-combustão (WETZEL, 1987; LEITÃO, 1988).

Alguns fatores tais como: manejo, umidade, temperatura, condições de armazenamento, infestação por artrópodes, níveis de contaminação por materiais estranhos (insetos inteiros, fragmentos de insetos, pêlos de roedores, e bárbulas de penas), nível de oxigênio, condições físicas e sanitárias da semente ou do grão, favorecem o desenvolvimento fúngico neste produto (LÁZZARI, 1993).

Os cereais, após secagem eficiente, podem ser conservados, sem grandes problemas, por longos períodos de tempo. Entretanto, se as condições de armazenamento não forem adequadas, os fungos provenientes do campo, assim como aqueles adquiridos durante o manejo, podem desenvolver-se e produzir metabólitos secundários altamente tóxicos, mais conhecidos como micotoxinas.

Monitorando a microbiota do milho em grão, triturado e de farinha de milho de três moinhos situados em Kansas, Nebraska e Oklahoma (USA), BOTHAST *et al.* (1974) registraram a ocorrência do gênero *Fusarium* e *Penicilium* em aproximadamente 50% dos grãos examinados. Foram isolados também *A.flavus*, outras espécies de *Aspergillus*, *Nigrospora*, *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Trichoderma*, *Chaetomium* e mucoraceas.

Analisando milho pós-colheita de Indiana (U.S.A.), RAMBO *et al.* (1974) não detectaram contaminação por *A.flavus* em nenhuma das 156 amostras colhidas durante o ano de 1971 e apenas 0,08% das amostras colhidas no ano seguinte apresentavam este patógeno como contaminante. Em suas observações os autores compararam ainda a ocorrência de *F.moniliforme* em grãos inteiros e danificados.

HESSELTINE *et al.* (1976) constataram que 75,4% das 297 amostras de milho colhidas em sete regiões da Carolina do Sul (USA), apresentaram 100% de contaminação fúngica interna nos grãos. Observaram ainda que um ou mais grãos entre cinquenta examinados de cada uma das 185 amostras analisadas estavam infectadas por *A.flavus*.

Com o objetivo principal de determinar os níveis de contaminação por *A.flavus* e aflatoxinas na pré-colheita, em milho produzido na região de Iowa (U.S.A.) em 1975, LILLEHOJ *et al.* (1977) determinaram alguns parâmetros tais como: teor de umidade, exame de fluorescência sob luz ultra violeta de comprimento de onda longo (365 nm), quantificação de aflatoxinas e colonização fúngica. Puderam observar em seus resultados que em 83 amostras examinadas microbiologicamente, 60% apresentavam contaminação por *A.flavus*.

KUSHALAPPA (1979) detectou a incidência do fungo *A.flavus* variando de 4 a 34% em amostras de espigas, sementes e farinha de milho e em sementes de feijão produzidas no Estado de Minas Gerais. Das 26 cepas do fungo *A.flavus*

isoladas e testadas para produção de aflatoxinas em "coconut agar medium", 19 foram positivas para síntese de aflatoxina B1.

ALMENAR *et al.* (1980) estudando a presença de fungos e aflatoxinas em 31 amostras de milho, procedentes da Argentina e U.S.A., armazenadas em sete silos localizados na província de Valencia, Espanha, detectaram *A.flavus* em todas as amostras. Observaram ainda que a maior incidência do fungo era nos grãos de milho procedentes da região do Prata, Argentina, com contaminação de até 57,8% e que nas amostras provenientes do U.S.A., 48% dos grãos apresentavam este microrganismo em sua microbiota. Observaram ainda uma alta incidência de contaminação pelos gêneros *Penicillium* (88,8 e 91,6%), *Fusarium* (83,3 e 100%) e *Rhizopus* (44,4 e 74,9%) nas amostras do Prata e U.S.A., respectivamente.

Em trabalhos posteriores, HESSELTINE *et al.* (1981), registraram como predominantes as espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em grãos de milho desinfestados em 238 amostras da Carolina do Norte, e observaram a colonização prevalente por *A.flavus* em 31,8% dos 11.900 grãos analisados destas mesmas amostras.

SAUER *et al.* (1982) comparando os resultados obtidos de 1940 amostras de milho e 1653 de trigo dos U.S.A., retiradas de 79 "containers" destinados à exportação, e analisando os grãos após desinfestação superficial, concluíram que a contaminação por fungos de estocagem era cerca de 10 vezes maior no milho do que no trigo. Observaram ainda que o *A.glaucus* foi o fungo de estocagem mais comum, presente em quase todas as amostras de milho, e em

80% das de trigo, sendo que o *A.flavus* foi isolado em apenas 1% das amostras de trigo e em 70% das de milho. Várias espécies de *Penicillium* foram isoladas infectando, respectivamente, 7 e 0,1% dos grãos de milho e trigo.

Analisando 2.557 amostras de grãos estocadas em propriedades agrícolas de 27 estados nos U.S.A. no ano de 1980, SAUER *et al.* (1984) encontraram o *A.glaucus* como contaminante em 84%, 70% e 37% das amostras de milho, aveia e trigo, respectivamente, determinando ainda que este microrganismo era o invasor de 26, 20 e 14% dos grãos analisados destas mesmas amostras. Outras espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* foram encontradas, sendo que o *A.flavus* se fez presente em apenas 1,2% dos grãos de milho e menos que 0,1% dos grãos de cevada e de trigo, apresentavam infecção por este patógeno.

CRUZ *et al.* (1984) detectaram a presença de *A.melleus* e *A.ochraceus* (*A.alutaceus*), fungos produtores de ocratoxina, tanto na ração como no milho utilizados na alimentação de animais. Observaram ainda uma alta contaminação por várias espécies de fungos no milho, tanto no campo quanto na estocagem.

BLANEY *et al.* (1986), após examinarem visualmente a descoloração e colonização fúngica em 174 amostras de milho pós-colheita de 80 regiões produtoras de North Queensland (Austrália), selecionaram 28 sub-amostras nas

quais isolaram de grãos previamente desinfestados superficialmente, *Fusarium graminearum*, *F.subglutinans*, *F.oxysporum*, *A.flavus*, *A.niger*, *Penicillium* sp, *Trichoderma* sp., *Nigrospora* sp., *Curvularia* sp., *Drechslera* sp., *Acremonium zeae* e *Rhizoctonia* sp.

Averiguando a microbiota interna e externa de grãos de milho recentemente colhidos e estocados em condições controladas, McLEAN & BERJAK (1987) entre muitas observações obtidas em suas investigações, destacaram a ausência do gênero *Aspergillus* na microbiota externa dos grãos, embora tenham isolado da superfície dos grãos várias espécies de fungos de campo, dos gêneros *Fusarium* e *Penicillium*. As espécies *A.flavus* e *A.glaucus* foram detectadas como contaminantes da parte interna das sementes. Em função dos resultados obtidos, os autores deste trabalho postularam que a diferença entre os fungos de campo e de estocagem pode não ser bem definida.

CARBALLO & MIGUEL (1987), analisando 133 amostras de rações para animais e de grãos de cereais, entre as quais 33 amostras de milho, coletadas em diferentes fazendas e armazéns, isolaram, identificaram e testaram quanto ao potencial para produção de aflatoxinas, 67 culturas de *A.flavus*, verificando que 15% destes isolados eram aflatoxina-positivos, e que nas amostras de milho, 23% dos isolados deste microrganismo eram capazes de produzir aflatoxinas.

Com o objetivo de avaliar a eficiência do óleo de canela individualmente e em presença de cloreto de sódio quanto a inibição da invasão por fungos em milho estocado, CHATTERJEE (1989) determinou a infecção fúngica nos grãos,

observando que o *A.flavus* e *A.glaucus*, eram as espécies predominantes que invadiam os grãos durante o processo de estocagem.

Identificando a microbiota interna e externa dos grãos de milho em 178 amostras coletadas nas regiões de maior produção da Argentina durante o ano de 1990, GONZÁLEZ *et al.* (1995) constataram que os gêneros *Fusarium* e *Penicillium* foram prevalentes, respectivamente na micobiota interna e externa. Observaram ainda que, dentro do gênero *Aspergillus*, a espécie *A.flavus* foi o fungo predominante, isolado tanto da microbiota interna como da externa. Relataram ainda que estes fungos eram contaminantes internos em 1,35% dos grãos de 21,35% das amostras analisadas.

HALFON-MEIRI & GOLAN (1990), correlacionando a descoloração marrom em tecidos do embrião de sementes de milho de pipoca com a microbiota fúngica, evidenciaram que 81% das amostras estavam infectadas, e observaram que o *A.chevalieri* foi o fungo mais comum nos tecidos embrionários, seguidos por *A.ochraceus*, *A.repens*, *P.frequentans* e *A.melleus*.

SINHA (1990) investigando a microbiota fúngica de amostras de milho colhidas por três anos em vários estados da Índia, encontrou o *A.flavus* como o fungo de maior incidência em todas as amostras analisadas, constatando ainda que, nos 248 isolados deste microrganismo, que 62% destes apresentavam potencial para produção de aflatoxinas.

Pesquisando a microbiota fúngica e espécies aflatoxígenas do gênero *Aspergillus* em 90 amostras de grãos de milho armazenado procedentes de várias regiões do Brasil, ASEVEDO *et al.* (1994), isolaram oito gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Acrenomium*, *Cladosporium*, *Neurospora* e *Paecilomyces*. Observaram, que a espécie mais freqüente do gênero *Aspergillus* era o *A.flavus*, presente nas amostras com umidade entre 14 e 18% e que 39,4% destes isolados eram potencialmente produtores de aflatoxinas do grupo B. Constataram ainda, que todas culturas isoladas de *A.parasiticus*, terceira espécie mais freqüente detectada nas amostras com teor de umidade entre 13 e 18%, produziram aflatoxinas B1, B2, G1, G2. Outras espécies do gênero *Aspergillus* isoladas foram: *A.ochraceus*, *A.petrakii*, *A.chriselius*, *A.versicolor*, *A.sydowi*, *A.fumigatus* e *A.niger*, encontradas nas amostras de milho com umidade entre 12 e 13%.

ADEBAJO *et al.* (1994), isolaram 31 espécies de fungos, principalmente, toxígenos e pertencentes a 11 gêneros em 50 amostras de milho, bolo e broa de milho coletadas em diferentes fazendas e produtores dos estados do sudoeste da Nigéria. Os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* constituíram 90, 94 e 88% do total dos fungos isolados nas respectivas amostras citadas. Todos os isolados de *A.flavus* e *A.ochraceus* testados produziram respectivamente, aflatoxina B1 e ochratoxina A.

LEONI *et al.* (1994), analisando 18 amostras de milho recém-colhido, safra de 1992, provenientes de diferentes municípios do Estado de São Paulo, observaram uma contaminação entre 14 a 18% por *Fusarium* spp.

Semelhantemente, CASTRO *et al.* (1994) isolaram de 80 amostras de milho provenientes do estado de São Paulo, várias espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, sendo as espécies *A.flavus* e *A.parasiticus* as mais freqüentes, muito embora não tenham detectado nos grãos destas mesmas amostras, aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona e esterigmatocistina .

STELLA & MARTÍNEZ (1994) analisando 17 amostras adquiridas em supermercados, de milho amarelo, e 20 de milho branco coletadas de caminhões, observaram maior incidência de *A.flavus*, *A.niger*, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp , *F.moniliforme*, *A.ochraceus*, *Aspergillus* sp e *Rhizopus* sp no milho amarelo

Estudando a microbiota fúngica de 69 amostras de milho pré e pós-colheita em quatro regiões de Honduras entre Outubro de 1992 e Novembro 1993, JULIAN *et al.* (1995) isolaram *F.moniliforme*, *F.moniliforme* var. *subglutinans*, *Penicillium* spp., *Stenocarpella maydis*, *S.macrospora* e *Acremonium* spp. Determinaram que os níveis de contaminação por fungos de estocagem eram baixos, embora três amostras tenham apresentado altos níveis de contaminação por *A.flavus*.

NICÂCIO *et al.* (1995) analisando a microbiota de 10 variedades de milho após a colheita observaram 100% de contaminação por *Fusarium*, seguido de 60% por *Penicillium* e 35% por *Aspergillus*. Estimou ainda, o potencial toxígeno de seis espécies de *A.flavus*, concluindo que três destes isolados foram capazes de produzir aflatoxina B1.

ONO *et al.* (1995) avaliando 28 amostras de milho proveniente do Estado do Paraná, constataram que todas as amostras analisadas estavam contaminadas com *Penicillium* sp e que em 24 destas amostras o gênero *Fusarium* se fez presente.

POZZI *et al.* (1995), ao analisarem 130 amostras de milho pós-colheita e armazenado no município de Ribeirão Preto - SP, verificaram como os fungos mais freqüentes os gêneros: *Fusarium* spp. (83,8%), *Penicillium* spp. (55,3%) e *Aspergillus* spp. (40.7%).

Analisando a micobiota de milho recentemente colhido em 16 regiões do Estado de São Paulo, CASTRO *et al* (1995) determinaram que *Fusarium* e *Penicillium* eram os gêneros de fungos potencialmente produtores de toxinas com maior incidência nos grãos das amostras analisadas. Em menor freqüência, várias espécies de *Aspergillus* também foram isoladas tais como: *A.versicolor*, *A.flavus*, *A.niger*, *A.alutaceus*, *A.wentii*, *Eurotium chevalieri*, *E.rubrum*, *E.amstelodami*,

E.repens, *Penicillium variable*, *P.fumiculosum*, *P.citrinum*, *P.pinophilum*, *P.brevicompactum*, *P.canescens*, *P.raistriki* e *P.spinulosum*. Dos 17 isolados de *A.flavus* testados quatro eram produtores de aflatoxinas B1 ou B1 e B2.

Investigando a ocorrência de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, a incidência de *A.flavus* e sua capacidade de produzir estes metabólitos em 100 amostras de milho e seus derivados, SANCHIS *et al.* (1995), observaram uma alta percentagem de amostras contaminadas com *A.flavus*, muito embora somente 9% de um total de 43 isolados deste patógeno eram comprovadamente tóxicos.

LOZADA (1995), estudando a morfologia de isolados fúngicos, identificou 41 espécies em 26 amostras de alimentos e rações para animais, detectando a produção de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em culturas de *A.flavus*, patulina e ácido ciclopiazônico em *A.giganteus* e *A.oryzae*, respectivamente.

Com a finalidade de detectar a presença de fungos tóxicos em milho amarelo utilizado no consumo humano e animal, SALDAÑA & LAYZA (1996) analisaram 100 amostras provenientes da Argentina, U.S.A., e Peru. Concluíram que as amostras peruanas eram as que apresentavam maior contaminação. Isolaram, identificaram e constataram a ação tóxica de *A.wentii*, *A.ochraceus* e *F.moniliforme*.

2.3. Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários sintetizados por alguns fungos, no final da fase exponencial ou no início da fase estacionária do seu

crescimento. Com composição química de baixo peso molecular, e altamente ionizáveis, estes metabólitos podem reagir com certos compostos presentes nas células eucarióticas, provocando efeitos biológicos indesejáveis ou deletérios em animais, plantas ou microrganismo. Entretanto, nem todos os metabólitos secundários produzidos por fungos são tóxicos e, a presença de micotoxinas não pode ser prevista baseando-se apenas no isolamento e determinação de uma espécie de fungo, pois, já foi comprovado que somente algumas cepas de uma mesma espécie têm a capacidade de sintetizar toxinas. Deve-se considerar ainda que um determinado fungo pode ser capaz de produzir mais que uma toxina e que certas toxinas podem ser produzidas por diferentes gêneros de fungos (MARTÍN *et al.* 1990; BELÉM, 1994).

2.3.1. Aflatoxinas

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos, principalmente, por *A.flavus* e *A.parasiticus*. Cerca de 17 compostos químicos do grupo das aflatoxinas são conhecidos, entretanto as mais encontradas nos alimentos são as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. Destas quatro principais toxinas, a aflatoxina B1 é a mais tóxica, tendo o fígado como alvo principal. É hepatotóxica, mutagênica, carcinogênica, possivelmente teratogênica e imunossupressora. As aflatoxinas, quimicamente, pertencem ao grupo das bifuranocumarinas que fluorescem sob luz ultra violeta de comprimento de onda 365 nm, emitindo fluorescência azul ("blue") as aflatoxinas B1 e B2 e verde ("green") as aflatoxinas G1 e G2. São solúveis em

solventes moderadamente polares como clorofórmio e metanol e pouco solúveis em água. Apresentando ponto de fusão ao redor de 269°C, são sensíveis à luz ultra-violeta quando dissolvidas em soluções polares, podendo ser destruídas por calor fluente sob pressão em presença de amônia e por tratamento com hipoclorito de sódio (VALLADARES, 1985; SMITH *et al.*, 1995).

2.3.2. Esterigmatocistina

A esterigmatocistina, caracteriza-se por possuir um sistema de um anel dihidrofurobensofurano acoplado a uma xantona. Esta toxina e seus derivados o-metil são intermediários na síntese da Aflatoxina B1 (KELLER *et al.*, 1994). Trata-se de uma micotoxina com importante atividade mutagênica e carcinogênica, semelhante a aflatoxina B1. Tem como principais órgãos-alvo o fígado e rins, induzindo a formação de tumores, podendo afetar ainda o coração, pulmão e baço. Este metabólito é sintetizado por várias espécies do gênero *Aspergillus*, principalmente pelo fungo *A. versicolor* (MARTÍN *et al.*, 1990).

Tabela 1: Procedência das amostras de milho analisadas.

AMOSTRA	CIDADE	AMOSTRA	CIDADE
01	Apucarana	31	Apucarana
02	Andradá	32	Sarandi
03	Apucarana	33	Apucarana
04	Apucarana	34	Andradá
05	Apucarana	35	Andradá
06	Apucarana	36	Apucarana
07	Sarandi	37	Andradá
08	Sarandi	38	Apucarana
09	Sarandi	39	Apucarana
10	Sarandi	40	Andradá
11	Apucarana	41	Apucarana
12	Sarandi	42	Apucarana
13	Andradá	43	Sarandi
14	Sarandi	44	Andradá
15	Andradá	45	Apucarana
		46	Apucarana
		47	Sarandi

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local da pesquisa

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Microbiologia/Microscopia e Micotoxilogia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos (EMBRAPA/CTAA), Rio de Janeiro, RJ.

3.2. Amostras analisadas

Foram utilizadas 60 amostras de milho, provenientes de três localidades do Estado do Paraná (Tabela 1) e, enviadas ao CTAA, por indústrias moageiras cooperativadas da Associação das Indústrias Moageiras de Milho

Tabela 1: Procedência das amostras de milho analisadas.

AMOSTRA	CIDADE	AMOSTRA	CIDADE
01	Apucarana	31	Apucarana
02	Andirá	32	Sarandi
03	Apucarana	33	Apucarana
04	Apucarana	34	Andirá
05	Apucarana	35	Andirá
06	Apucarana	36	Apucarana
07	Sarandi	37	Andirá
08	Sarandi	38	Apucarana
09	Sarandi	39	Apucarana
10	Sarandi	40	Andirá
11	Apucarana	41	Apucarana
12	Sarandi	42	Apucarana
13	Andirá	43	Sarandi
14	Sarandi	44	Andirá
15	Andirá	45	Apucarana
16	Sarandi	46	Apucarana
17	Sarandi	47	Sarandi
18	Andirá	48	Apucarana
19	Sarandi	49	Apucarana
20	Apucarana	50	Apucarana
21	Andirá	51	Apucarana
22	Apucarana	52	Apucarana
23	Apucarana	53	Andirá
24	Apucarana	54	Andirá
25	Sarandi	55	Apucarana
26	Apucarana	56	Apucarana
27	Apucarana	57	Apucarana
28	Apucarana	58	Apucarana
29	Sarandi	59	Sarandi
30	Sarandi	60	Apucarana

(ABIMILHO). A metodologia adotada para amostragem foi a recomendada por FONSECA (1991) e adotada pelo Ministério da Agricultura para análises de micotoxinas de grãos a granel. O sistema consiste na aplicação da fórmula $N = 6\sqrt{n}$, onde N representa o número de sub-amostras (400g) e "n" o número de toneladas do lote, sendo que 10 sub-amostras formam uma amostra.

No CTAA, as amostras foram novamente homogeneizadas e, porções de, aproximadamente, 500 g foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia/Microscopia.

Alguns parâmetros foram avaliados tais como: teor de umidade, atividade de água, exteriorização dos fungos dos grãos, isolamento dos fungos desenvolvidos, identificação dos fungos do gênero *Aspergillus* e seus teleomorfos, avaliação do potencial toxígeno dos fungos selecionados.

3.3. Determinação da umidade

Foi determinada, através da desidratação de grãos triturados, segundo normas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1988). Em pesa-filtros, previamente tarados foram pesados 5 gramas dos grãos triturados, em seguida, aquecidos a 105°C durante duas horas, resfriados em dessecador até a temperatura ambiente e pesados. Esta operação foi realizada até a obtenção de peso constante.

3.4. Determinação da atividade de água (Aa)

A atividade de água foi determinada no equipamento aparelho Novasina[®], pré-calibrado com soluções salinas saturadas (GREENSPAN, 1977). Foram utilizadas aproximadamente 10g dos grãos triturados e realizadas leituras diretas até o equilíbrio com o ambiente.

3.5. Exteriorização de fungos nos grãos

Foram selecionados 40 grãos de cada amostra (ALMENAR *et al.* 1980), aparentemente sadios. Estes foram tratados com solução comercial de hipoclorito de sódio a 2% de cloro livre residual, durante 2 minutos (LILEHOJ *et al.* 1977; SINHA, 1990) em seguida os mesmos foram rinsados três vezes em água esterilizada, e transferidos assepticamente para placas de Petri esterilizadas, com 150 mm de diâmetro, contendo um disco de espuma sintética umedecido com água destilada esterilizada. A incubação foi realizada em estufa BOD a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por um período de 7 a 14 dias, até a exteriorização e desenvolvimento dos fungos (HESSELTINE, 1981; MENDES, 1984; DALCERO & ETCHEVERRY, 1994; MAZZANI, 1994). As observações referentes aos grãos colonizados por fungos foram realizadas com auxílio de microscópio estereoscópico.

3.6. Isolamento dos fungos desenvolvidos

As culturas fúngicas desenvolvidas foram semeadas em ágar Czapeck-Dox e purificadas, através da transferência sucessiva de conídios em placas de

Petri contendo ágar Czapeck-Dox. Posteriormente estas culturas foram identificadas a nível de gênero, de acordo com ONIONS *et al.* (1981); FASSATIOVÁ (1986); KLICH & PITT (1994); PITT (1991); SAMSON *et al.* (1995).

3.7. Identificação dos fungos do gênero *Aspergillus* e seus teleomorfos

As culturas do gênero *Aspergillus* com coloração verde e verde amarelado foram inoculadas em ágar *Aspergillus* Differential Medium (ADM) BOTHAST & FENNELL (1974), distribuído em tubos de ensaio, para seleção das espécies *A.flavus* e *A.parasiticus*, que não esporulam e produzem pigmentação alaranjada no reverso das colônias neste meio de cultivo. Posteriormente, estas espécies foram identificadas em Czapeck-Dox, considerando a predominância da disposição das métulas nas cabeças conidiais (uni ou bisseriada) e a ornamentação dos conídios (KLICH & PITT, 1994).

As culturas negativas para o teste em ADM e as demais culturas de coloração verde do gênero *Aspergillus* e com formação de cleistotécios, foram inoculadas em meio Czapeck yeast extract agar (CYA) a 25° e 37°C e em malt extract agar (MEA) a 25°C. As observações dos caracteres (macroscópicos e microscópicos) foram realizadas com 7 e 14 dias de incubação e interpretadas com uso das chaves de identificação de KLICH & PITT (1994); SAMSON *et al.* (1995), a fim de selecionar as espécies *Eurotium amstelodami* e *E.chevalieri*.

3.8. Avaliação do potencial toxígeno dos fungos selecionados

3.8.1. *A.flavus* e *A.parasiticus*

Os isolados fúngicos destas espécies, foram inoculados em um ponto central de ágar coco (CAM) segundo LIN e DIANESE (1976) e incubados em estufa BOD a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 7 dias. As colônias desenvolvidas e o meio ao seu redor foram transferidos para cápsulas de porcelana e macerados com a adição de 30 mL de clorofórmio. Os extratos obtidos foram filtrados em papel de filtro, concentrados em Rotavapor ¹ e ressuspensos em 20 μL de clorofórmio. Em seguida, foram aplicados com o auxílio de microseringa, 10 μL dos extratos fúngicos juntamente com 5 μL dos padrões de Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 ², preparados segundo AOAC (1995), em cromatofolhas ³ de sílica gel 60 - 20 x 20 cm, 0,2 mm. A cromatografia foi desenvolvida em câmara previamente saturada com o sistema de solventes constituído de tolueno/acetato de etila/clorofórmio/ácido fórmico (70:50:50:20), (CRUZ *et al.*, 1992), até atingir a linha de "front" (18 cm da base da placa). Após a corrida cromatográfica, as placas foram retiradas, secas à temperatura ambiente e examinadas sob luz ultra-violeta ⁴ de 365 nm de comprimento de onda. A confirmação da identidade de AF B1 e G1 foi realizada por derivatização química com ácido tricloroacético conforme AOAC 975.37 (1995). Este procedimento acima descrito, foi previamente avaliado, utilizando-se culturas referência de *A.flavus* 0010 e *A.parasiticus* 0061 da Coleção

1- BUCHI

2- Sigma Company

3- Merck

4- Cromato-Vue C-70 G

de Culturas do Centro de Micologia e Micotoxicologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

3.8.2. *Eurotium amstelodami* e *E.chevalieri*

Os isolados fúngicos destas espécies foram avaliados quanto a síntese de esterigamatocistina, em duas condições de cultivo:

- a) Inoculação em ponto central de ágar amendoim (BASTOS, 1979), constituído de 40 g de amendoim, sem película, fervidos durante 15 min, filtrados em camada dupla de gaze e volume completado a 200 mL, adicionado de 3,5 de ágar-ágar e autoclavado a 121°C por 15 min. Após um período de incubação de 20 dias em estufa BDO a 28°C, as colônias desenvolvidas e o meio ao seu redor foram transferidos para cápsulas de porcelana e macerados com a adição de 30 mL de clorofórmio. O macerado foi submetido a tratamento em banho-maria com ultra-som⁵ por 15 min, filtrado em papel de filtro, concentrados em Rotavapor e ressuspensos em 1mL de clorofórmio.
- b) Inoculação com 10 mL de uma suspensão de esporos em "tween 80", em trigo triturado (25g) colocados em erlenmeyer de 125 mL, preparados através da trituração em moinho de faca com peneira de 20 "mesh" e autoclavado a 121°C por 15 min. Após o período de incubação de 20 dias em estufa BDO a 28°C, o meio colonizado foi macerado com 100mL de acetonitrila/cloreto de potássio 4% (90:10),

seguido de extração por partição com hexano e clorofórmio. Após a concentração em Rotavapor, o resíduo foi dissolvido com 2 mL de metanol e 200 μ L desta solução foi pipetada para um cartucho Sep-Pak C_{18} ⁶ e eluindo, inicialmente, com 3 mL de metanol a 50%. Este volume foi desprezado, e realizada uma segunda eluição com 10 mL de metanol/água (60:40), que foi filtrado através de membrana Millipore ⁷ de 0,45 μ m.

Os extratos obtidos nas condições acima citadas (a e b), foram cromatografados, em camada delgada como descrito no item 3.8.1., modificando-se o sistema de solventes para benzeno/ácido acético/metanol (90:5:5), utilizando-se o padrão de esterigmatocistina ⁸, preparado segundo AOAC (1995). Estas placas foram reveladas com solução de cloreto de alumínio a 20% e aquecimento por 10 minutos em estufa a 100°C.

Os extratos acima mencionados, foram também injetados (20 μ L de cada um) em Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), equipado com coluna Novapak C_{18} (15cm x 4mm de diâmetro interno), tamanho de partícula de 4 μ m, injetor 6125, LC10 - AD detetor Ultra-Violeta SPD -10 A ⁹ ajustado a 256 nm e acoplado a um software, utilizando-se a fase móvel metanol/água (65:35) (SCHMIDT, 1981).

6- Waters Assoc.

7- Millipore

8- Sigma Company

9- Shimadzu

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas 60 amostras analisadas, os valores obtidos pela determinação do teor de umidade, como mostra a Figura 1, indicam que 95% das amostras apresentam-se em níveis aceitáveis e somente 5% encontram-se próximo do limite crítico para armazenagem conforme LÁZZARI (1993). Este autor relata que a manutenção da qualidade de sementes, grãos e rações depende quase que totalmente do seu teor de umidade, mais especificamente da umidade relativa do ar intergranular, da temperatura do produto e do tempo de armazenamento. e cita ainda que, em relação ao milho, o teor de umidade máximo para armazenagem sem risco de deterioração em qualquer condição climática é de 14,0%.

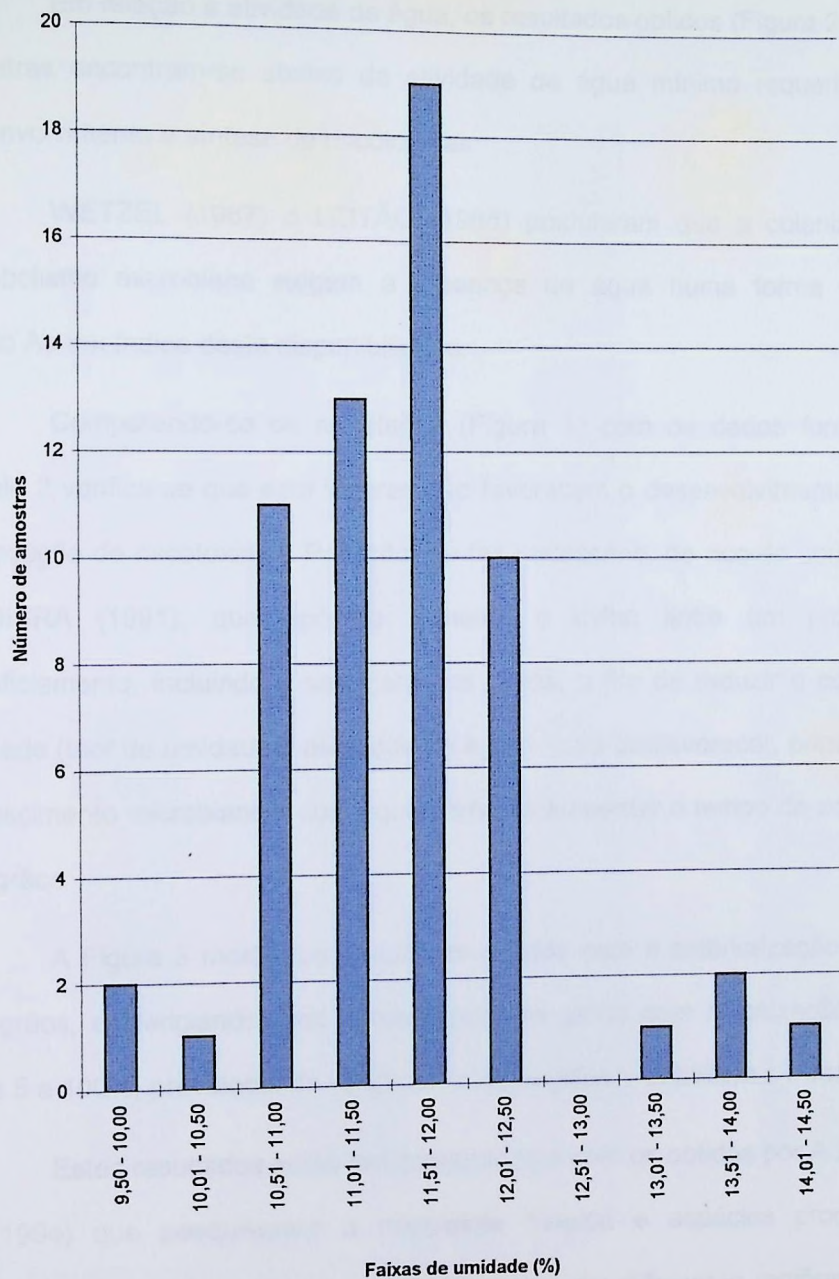


Figura 1: Teor de umidade das amostras analisadas

Em relação a atividade de água, os resultados obtidos (Figura 2), todas as amostras encontram-se abaixo da atividade de água mínima requerida para o desenvolvimento e síntese de micotoxinas.

WETZEL (1987) e LEITÃO (1988) postularam que a colonização e o metabolismo microbiano exigem a presença de água numa forma disponível, sendo Aa um índice desta disponibilidade.

Comparando-se os resultados (Figura 1) com os dados fornecidos na Tabela 2 verifica-se que estes valores não favorecem o desenvolvimento fúngico e a produção de micotoxinas. Portanto, se faz necessário, de acordo com BAUDET & MISRA (1991), que após a colheita, o milho sofra um processo de beneficiamento, incluindo a secagem dos grãos, a fim de reduzir o conteúdo de umidade (teor de umidade e atividade de água), para desfavorecer, principalmente, o crescimento microbiano e consequentemente aumentar o tempo de conservação dos grãos.

A Figura 3 mostra os resultados obtidos com a exteriorização de fungos nos grãos, evidenciando uma percentagem de grãos com colonização, variando entre 5 a 100%, prevalecendo os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

Estes resultados estão em concordância com os obtidos por ASEVEDO *et al.* (1994) que pesquisaram a microbiota fúngica e espécies produtoras de aflatoxina, em 90 amostras de milho estocados em diferentes regiões do Brasil,

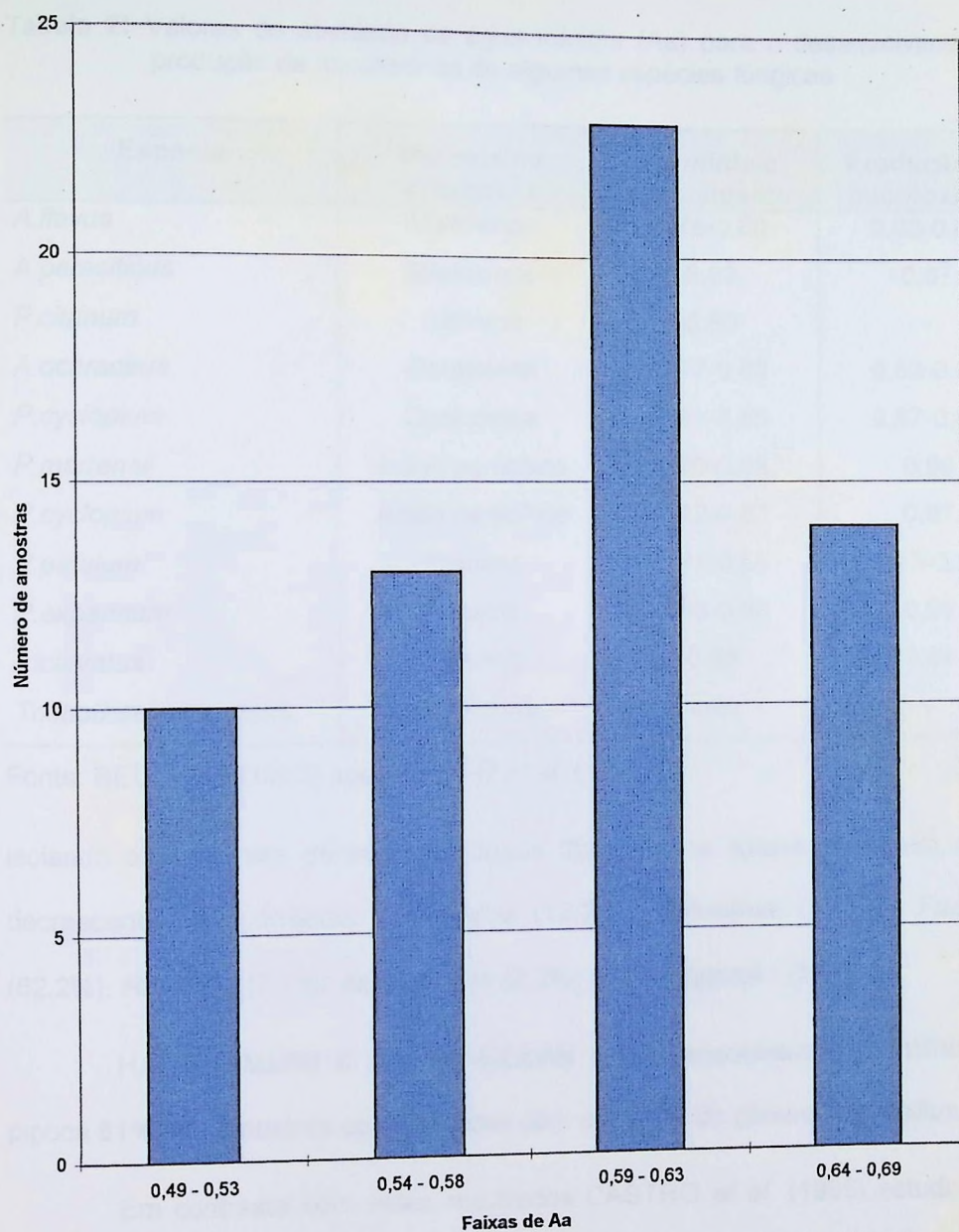


Figura 2: Valores da Atividade de Água (Aa) das amostras analisadas

Tabela 2: Valores de atividade de água mínima (Aa) para o desenvolvimento e produção de micotoxinas de algumas espécies fúngicas

Espécie	Micotoxina produzida	Aa mínima Crescimento	Produção de micotoxinas
<i>A.flavus</i>	Aflatoxinas	0,78-0,80	0,83-0,87
<i>A.parasiticus</i>	Aflatoxinas	0,82	0,87
<i>P.citrinum</i>	Citrinina	0,80	-
<i>A.ochraceus</i>	Ocratoxina	0,77-0,83	0,83-0,87
<i>P.cyclopium</i>	Ocratoxina	0,81-0,85	0,87-0,90
<i>P.martensii</i>	Ácido penicílico	0,79-0,83	0,99
<i>P.cyclopium</i>	Ácido penicílico	0,82-0,87	0,97
<i>P.patulum</i>	Patulina	0,81-0,85	0,85-0,95
<i>P.expansum</i>	Patulina	0,83-0,85	0,99
<i>A.clavatus</i>	Patulina	0,85	0,99
<i>Trichothecium roseum</i>	Tricoteca	0,90	-

Fonte: BEUCHAT (1983) *apud* LEITÃO *et al.* (1988)

isolando os seguintes gêneros de fungos filamentosos apresentados em ordem decrescente de ocorrência: *Aspergillus* (72,2%), *Penicillium* (67,7%), *Fusarium* (62,2%), *Rhizopus* (7,7%) *Acremonium* (2,2%) e *Cladosporium* (1,1%).

HALFON-MEIRI & BARKAI-GOLAN (1990) encontraram em milho para pipoca 81% das amostras contaminadas com espécies do gênero *Aspergillus*.

Em contraste com estes resultados CASTRO *et al.* (1995) estudando a microbiota em milho coletados em diferentes localidades do Estado de São Paulo,

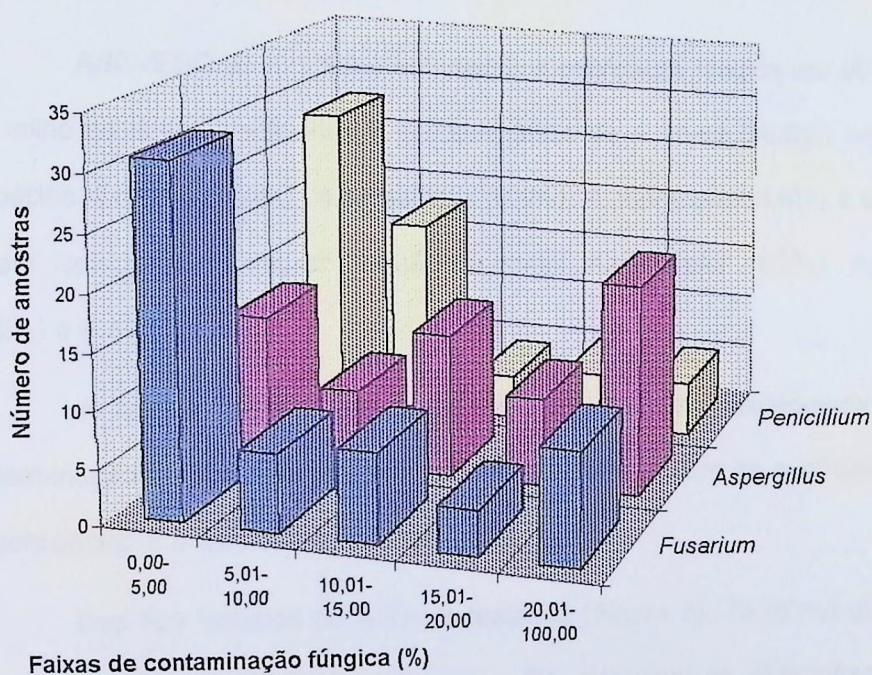


Figura 3: Faixas de contaminação fúngica em milho pós-colheita no Estado do Paraná

verificaram que os gêneros predominantes eram *Fusarium* e *Penicilium* enquanto que o gênero *Aspergillus* foi o de menor frequência.

Em 169 isolados do gênero *Aspergillus*, identificados a nível de espécie, o *A.flavus* (64%) foi predominante, seguido por *E.amstelodami* com 19%, *E.chevalieiri* 10% e *A.parasiticus* 7%.

ASEVEDO *et al.* (1994) estudando a microbiota fúngica em 90 amostras de milho no Brasil, verificaram a predominância de *A.flavus* (36,6%) seguido das espécies *A.oryzae* (9,9%), *A.parasiticus* (6,6%), *A.ochraceus* (6,6%) e outras que foram isoladas com menor frequência como: *A.versicolor* (2,2%), *A.fumigatus* (2,2%) e *A.niger* (1,1%).

A fim de atender aos objetivos deste trabalho, experimentos para a determinação do potencial toxígeno, foram conduzidos com as espécies *A.flavus*, *A.parasiticus*, *E.amstelodami* e *E.chevalieiri*.

Dos 109 isolados de *A.flavus* testadas (Figura 5), 73 (67%) sintetizaram aflatoxinas B1 e B2, 20 (18%) produziram B1, enquanto as aflatoxinas B1 e G1 foram sintetizadas por sete isolados (6%) e as B1, B2, G1

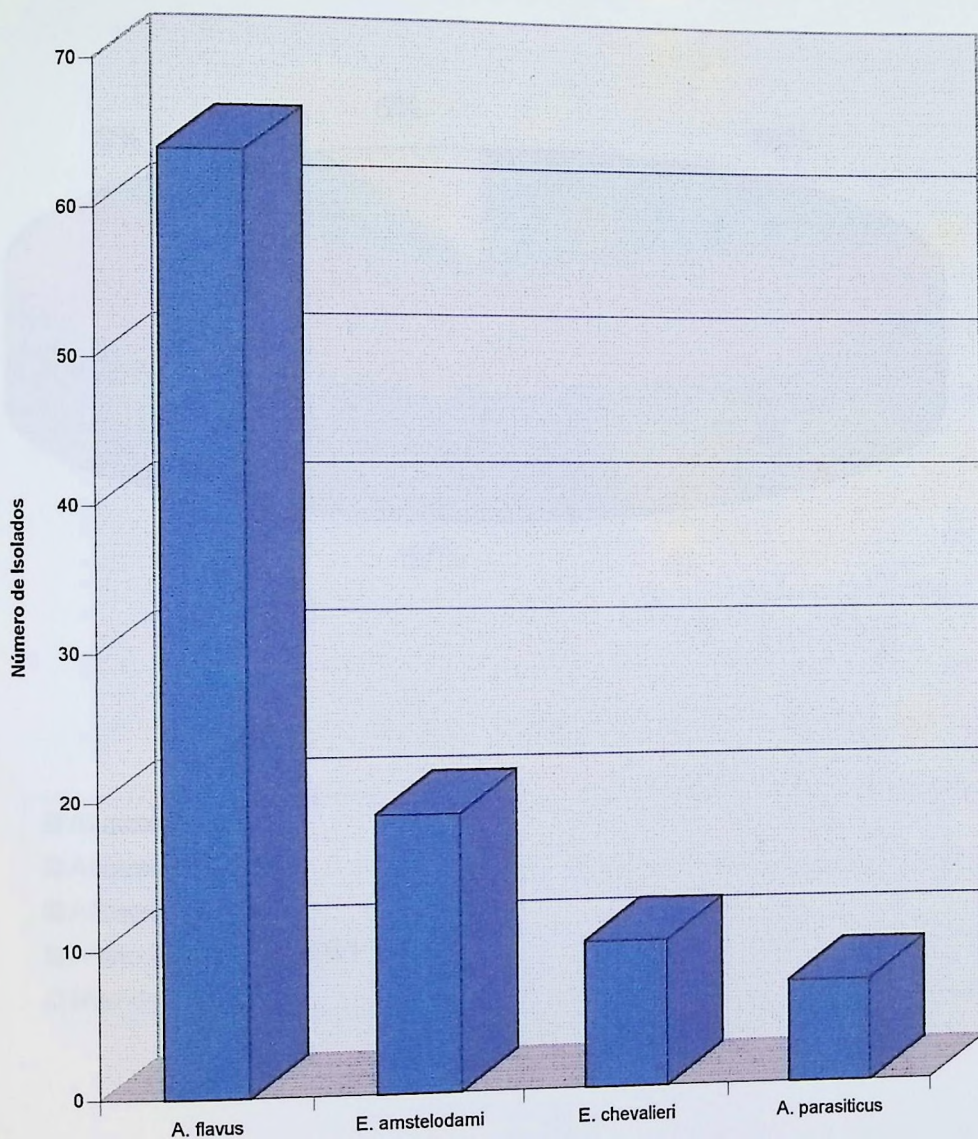
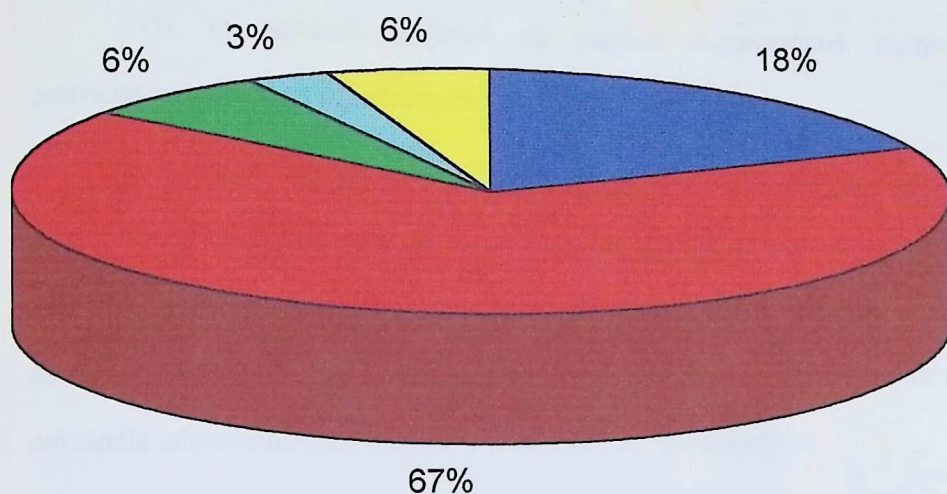


Figura 4: Espécies de *Aspergillus* e Teleomorfos Isolados e Identificados



- Aflatoxina B1
- Aflatoxina B1 e B2
- Aflatoxina B1, G1
- Aflatoxina B1, B2 e G1
- Não detectado

Figura 5: Potencial Tóxico das Espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*

por três isolados (3%), e em 6 (6%) isolados desta espécie, não foi detectado potencial para síntese.

Os 11 isolados fúngicos da espécie *A.parasiticus*, demonstraram, potencial para síntese de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.

Os dados obtidos com a avaliação do potencial toxígeno dos isolados fúngicos das espécies *A.flavus* e *A.parasiticus*, evidenciaram a variabilidade de cepas existentes quanto a síntese de metabólitos tóxicos dentro de uma mesma espécie, e a habilidade do *A.parasiticus* em sintetizar simultaneamente as quatro principais aflatoxinas (B1, B2; G1 e G2), também foi registrada.

Estes resultados obtidos, foram coerentes com os encontrados por RANJAN & SINHA (1991) que, estudando o potencial toxígeno de 385 isolados de *A.flavus* verificaram que 23% sintetizaram aflatoxina B1, 17% produziam B1 e B2, sendo que as aflatoxinas B1, B2 e G1 foram sintetizadas por 8% dos isolados.

ASEVEDO *et al.* (1994) também relataram em seus estudos que isolados de *A.flavus* eram toxígenos e produziram as aflatoxinas B1 ou B1 e B2 enquanto que, todas as cepas testadas de *A.parasiticus* produziram as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.

Muito embora a síntese de esterigmatocistina não tenha sido detectada pelas espécies *E.amstelodami* e *E.chevalieri* nas duas condições em que este experimento foi desenvolvido (cultivo e metodologia analítica), contrariando os relatos de SCHROEDER & KELTON (1975) e KARO & HADLOCK (1982) citados

por FRISVAD & THRANE (1995) e os estudos de EL-KADY *et al.* (1994). Entretanto, SMITH & MOSS (1985) e SINGH *et al.* (1991) e mais recentemente FRISVAD & THRANE (1995), referem-se a estas espécies como não produtoras deste metabólito. Porém, o isolamento destas espécies, consideradas xerofílicas, é um fator importante, considerando que estes microrganismos, em suas reações metabólicas produzem água, favorecendo o desenvolvimento de outras espécies fúngicas contaminantes (SAUER, 1982; VALLADARES, 1985). Pode-se atribuir a não detecção da síntese deste metabólito, nas condições experimentais desenvolvidas neste trabalho, à três fatores: as condições de cultivo não foram favoráveis, os isolados não possuíam potencial para síntese de esterigmatocistina, ou esta micotoxina foi produzida em níveis não detectáveis.

5. CONCLUSÕES

- O conteúdo de umidade dos grãos, nas condições em que estes foram estudados, apresentaram valores entre 9,78 e 14,06% para teor de umidade e entre 0,50 e 0,69 para atividade de água, valores estes desfavoráveis ao desenvolvimento fúngico e a síntese de micotoxinas.
- A contaminação endógena em grãos de milho, aparentemente sadios, variou entre 5 e 100%, prevalecendo os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, quando submetidas a incubação em câmara úmida.
- A identificação a nível de espécie em 169 isolados de *Aspergillus* e teleomorfos indicou a presença de 64% de *A.flavus*, 19% de *E.amstelodami*, 10% de *E.chevalieri* e 7% de *A.parasiticus*.

- Nos 109 isolados de *A.flavus*, a síntese de aflatoxinas foi de 66,97% para B1 e B2; 18,35% B1; 6,42% B1,G1; 2,75% B1, B2, G1 e em 5,50% não foi detectada a síntese destes metabólitos, quando testados em meio ágar coco. E em 11 isolados da espécie *A.parasiticus* testados nas mesmas condições foi observada a síntese de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.
- A síntese de esterigmatocistina, não foi detectada pelas espécies *E.amstelodami* e *E.chevalieri*, nas duas condições de cultivo desenvolvidas.
- Sugere-se como continuidade deste trabalho, o estudo do potencial toxígeno de *Fusarium* spp e *Penicillium* spp isoladas de milho pós-colheita, além do desenvolvimento de outras condições de cultivo com as espécies *E.amstelodami* e *E.chevalieri*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADEBAJO, L.O.; IDOWU, A.A.; ADESANYA, O.O. Mycoflora, and mycotoxins production in Nigerian corn and corn-based snacks. **Mycopathologia**, v. 126, p.183-192, 199 ^L
2. ALMENAR, V. S.; LUMBRERAS, A. S.; HABA, J.H.; *et al.* Contenido de aflatoxinas y *Aspergillus flavus* en maíz almacenado en silos comerciales. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v. 20, n. 3, p. 371-80, 1980.

3. ASEVEDO, I.G.; GAMBALE, W.; CORRÊA, B.; *et al.* Mycoflora and aflatoxigenic species of *Aspergillus* spp isolated from stored maize. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.25, n.1, p.46-50, 1994.
4. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15. ed. Virgínia: AOAC, 1995, cap. 49, p. 1- 49.
5. BAUDET, L.; MISRA, M. Atributos de qualidade de sementes de milho beneficiadas em mesa de gravidade **Revista Brasileira de Sementes**, v. 13, n. 2, p.91-97, 1991.
6. BASTOS, S.T.G. **Método rápido para detecção da produção de ocratoxina e esterigmatocistina por *Aspergillus* spp em meios de ágar**. Brasília: Universidade de Brasília, 1979. 77 p. (Tese de Mestrado)
7. BELÉM, P.A.D. **Introdução ao estudo das micotoxinas de interesse em medicina veterinária**. Viçosa: UFV, 1994. 18 p.
8. BLANEY, B.J.; RAMSEY, M.D.; TYLER, A.L. Mycotoxins and toxigenic fungi in insect-damaged maize harvested during 1983 in far North Queensland. **Aust. J. Agric. Res.**, v. 37, p. 235-44, 1986.
9. BOTHAST, R.J.; FENNELL, D. I. A Medium for rapid identification and enumeration of *Aspergillus flavus* and related organisms. **Mycologia**, v. 66, p.365-69, 1974.

10. BOTHAST, R.J.; ROGERS, R.F.; HESSELTINE, C.W. Microbiology of corn and milled corn products. **Cereal Chemistry**, v. 51, n. 6, p. 829-38, 1974.
11. CARBALLO, M.; MIGUEL, J.A.de. Rapid detection of aflatoxin-producing strains of the *Aspergillus flavus* group isolated from mixed feed and cereal grain in Spain. **J. Sci. Food Agric.**, v. 40, p. 11-15, 1987.
12. CASTRO, M.F.P.; SOARES, L.M.V.; FURLANI, R.P.Z. Mycoflora, aflatoxigenic species and mycotoxins in freshly harvested corn (*Zea mays* L.): a preliminary study. **Rev. Microbiol.**, v. 26, n. 4, p. 289-95, 1995.
13. CASTRO, M.F.P.P.M. de; SOARES, L.M.V.; FURLANI, R.P.Z.; *et al.* *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Fusarium*, spp and mycotoxins in freshly harvested corn (*Zea mays* L.). In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICOTOXICOLOGIA, 1 e ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 8, **Anais**, Rio de Janeiro, 1994. p. 70-72.
14. CHATTERJEE, D. An Effective formulation for mould- and aflatoxin-free storage of corn. **Letters in Applied Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 25-28, 1989.
15. CRUZ, L.C.H.; ROSA, C.A.R; CAMPOS, S.G.; *et al.* Ocratoxose em suínos no estado de Santa Catarina. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 6, p.24, 1984.
16. CRUZ, L.C.H. da ; CAMPOS, S.G. de; ROSA, C.A. da R. Aplicação do ágar-coco como meio diferencial para o isolamento de fungos citrininogênicos. **Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de Janeiro**, Itaguaí, v.15, n.1, p.61-64, 1992.

17. DALCERO, A.M.; ETCHEVERRY, M. **Curso de micologia**: apostila de aula. Córdoba :Universidade Rio Cuarto, 1994.
18. DALLAQUA, L.J. Dados sobre o consumo de milho no Estado do Paraná. 1996 (comunicação pessoal)
19. EL-KADY, I.; EL-MARAGHY, S.; ZOHRI, A. Mycotoxin producing potencial of some isolates of *Aspergillus flavus* and *Eurotium* groups from meat products. **Microbiological Research**, v. 149, p.297-307, 1994.
20. FASSATIOVÁ, O. Moulds and filamentous fungi in techical microbiology. **PROGRESS IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY**. New York :Elsevier, 1986. v. 22, p. 5 - 233.
21. FRISVAD, J.C.; THRANE. Mycotoxin production by food-borne fungi. In: SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; *et al.* **Introduction to food-borne fungi**. 4ª ed. Baarn, Centralalbureau voor Schimmelcultures, 1995. p.251-260.
22. FONSECA, H. Sistema de amostragem para análise de aflatoxinas em grãos. **Rev. Microbiol**, São Paulo, v.21, n.2, p.66-70, 1991.
23. GONZÁLEZ, H.H.L.; RESNIK, S.L.; BOCA, R.T.; *et al.* Mycoflora of Argentinian corn harvested in the main production area in 1990. **Mycopathologia**, v. 130, p. 29- 36, 1995.

24. GOODMAN, M.M.; SMITH, J.S.C. Botânica. In: Paterniani, E.; Viégas, G.P. (Eds.) **Melhoramento e produção do milho I**. 2.ed. Fundação Cargill:Campinas. 1987. p. 4.
25. GREENSPAN, L. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. **J. Res. NBSQS Phys. Chem.**, v.81A, n.1, p.89-93, 1977.
26. HALFON-MEIRI, A.; BARKAI-GOLAN, R. Mycoflora involved in seed germ discoloration of popcorn, and its effect on seed quality. **Mycopathologia**, v. 110, p. 37-41, 1990.
27. HAWKSWORTH, D.L.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C.; *et al.* **Dictionary of the fungi**. 8 ed., Ed. International Mycological Institute, Cambridge, UK, 1995. 616 p.
28. HESSELTINE, C.W.; SHOTWELL, O.L.; W.F.KWOLEK; *et al.* Aflatoxin occurrence in 1973 corn at harvest. II. Mycological studies. **Mycologia**, v.68, p. 341-53, 1976.
29. HESSELTINE, C. W.; ROGERS, R. F. ;SHOTWELL, O. L. Aflatoxin and mold flora in North Carolina in 1977 corn crop. **Mycologia** , v. 73, p. 216-228, 1981.
30. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**; métodos químicos e físicos para análises de alimentos. 3. ed., , São Paulo, 1988. v. 1, 533 p.

31. JULIAN, A.M.; WAREING, P.W.; PHILLIPS, S.I.; *et al.* Fungal contamination and selected mycotoxins in pre- and post-harvest maize in Honduras. **Mycopathologia**, v. 129, p. 5-16, 1995.
32. KELLER, N.P.; BUSTCHKO, R.A.E., SARR, B.; *et al.* A Visual pattern of mycototoxin production in maize kernels by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, v.84, n.5, p.48-488, 1994.
33. KIBUUKA, G.K. **Efeito da umidade e tempo de condicionamento nas características tecnológicas de milho branco var. BR 451.** Campinas: UNICAMP, 1993. 268 p. (Tese de Doutorado).
34. KLICH, M.A.; PITT, J.I. **A Laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs.** North Wales: CSIRO Division of Food Processing, 1994. 116 p.
35. KRUGNER, T.L.; BACCHI, L.M.A. Fungos. In: FILHO, A.B.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**, 3. Ed. São Paulo: Ed. Agronômica CERES, 1995. v. 1, p. 46-95.
36. KUSHALAPPA, A.C. Aflatoxin-producing fungi of *Aspergillus flavus* group in stored corn and beans in farms of Minas Gerais state. **Fitopatologia Brasileira**, v. 4, p. 391-395, 1979.

37. LÁZZARI, A.F. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. Curitiba, ed. do autor, 1993. 133 p.
38. LEONI, L.A.B. ; SOARES, L.M.V. Desenvolvimento de uma metodologia para determinação e confirmação de moniliformina em milho em milho. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICOTOXICOLOGIA, 1 e ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 8, **Anais**, Rio de Janeiro, 1994. p. 114- 15.
39. LEITÃO, M.F.F. Microbiologia de alimentos. In: ROITMAM, I.; TRAVASSOS, L.R.; AZEVEDO, J.L. **Tratado de microbiologia**. Ed. Manole: São Paulo, 1988. v.1, cap.1, p.3-81.
40. LILLEHOJ, E. B.; FENNELL, D.I.; KWOLEK, W.F. Aflatoxin and *Aspergillus flavus* occurrence in 1975 corn at harvest from a limited region of Iowa. **Cereal Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 366-72, 1977.
41. LIN, M.T.; DIANESE, J.C. A Coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. **Phytopathology**, v.66, n.12, p.1466-9, 1976.
42. LOZADA, A. F. Isolation and identification of mycotoxigenic fungi in selected foods and feeds. **Food additives and contaminants**, v. 12, n. 3, p. 509-514, 1995.

43. LUCAS, G.B.; CAMPBELL, C.L.; LUCAS, L.T. **Introduction to plant diseases, identification and management**. 2 ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992. 364 p.
44. MARTÍN, R.; HERNÁNDEZ, P.E.; SANZ, B. Intoxicaciones alimentarias de origen fúngico: micotoxicosis. **Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.**, v.30, n.3, p. 315-30, 1990.
45. MAZZANI, C. Hongos asociados a granos de cereales almacenados en Venezuela. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICOTOXICOLOGIA, 1 e ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 8, **Anais**, Rio de Janeiro, 1994. p. 58-60.
46. McLEAN, M. e BERJAK, P. Maize grains and their associated mycoflora - a microecological consideration. **Seed Sci. & Technol.**, v. 15, p. 831-50, 1987.
47. MENDES, M.A.S. **Influência de fungos isolados de produtos alimentícios na produção de aflatoxinas pelo grupo-espécie *Aspergillus flavus***. Brasília: Universidade de Brasília, 1984. 76 p. (Tese de Mestrado).
48. MILLS, J.T.; ABRAMSON, D. Production of sterigmatocystin by isolates of *Aspergillus versicolor* from western Canadian stored barley and rapeseed / canola. **Canadian journal of plant pathology**, v. 8, p. 151-153, 1986.

49. MUCHOVEJ, J.J.; MUCHOVEJ, R.M.C. **Noções básicas de micologia**. Viçosa: Ed. Folha de Viçosa, 1989. 155p.
50. NICACIO, M.A.S.; PRADO, G.; LINARDI, V.R. Determinação de aflatoxina e identificação da microbiota fúngica em milho (*Zea mayus* L) pós-colheita. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 8. 1995, Santos. **Programa & Resumos**, p 41.
51. ONIONS, A.H.S.; ALLSOPP, D.; EGGINS, H.O.W. **Smith's introduction to industrial mycology**. 7 ed. London: Edward Arnold, 1981. p.398.
52. ONO, E.Y.S.; BELLODI, S.M.; RODRIQUES, K.M.P.; *et al.* Avaliação da contaminação fúngica em amostras de milho da região sul do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18, 1995. **Programa & Resumos**, p. 35.
53. PITT, J.I. **A Laboratoty guide to common *Penicillium* species**. North Wales: CSIRO Division of Food Processing, 1991. 187 p.
54. POLLAK, L.M.; WHITE, P.J. Corn as a food source in the United States: part I: historical and current perspectives. **Cereal Foods World**, v. 40, n.10, p.749-753, 1995.

55. POZZI, C.R. **Milho pós-colheita e armazenado microbiota fúngica e a ocorrência de micotoxinas**. Pirassununga: Universidade de São Paulo, 1993. p.165 (Dissertação de Mestrado).
56. POZZI, C.R.; CORRÊA, B.; GAMBALE, W.; *et al.* Post-harvest and stored corn in Brazil : mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxin occurrence. **Food additives and contaminants**, v.12, n.3, p. 313-19, 1995.
57. PROGNÓSTICO AGRÍCOLA 1993/1994; Algodão, amendoim, arroz, feijão, mandioca, milho e soja. **Informações econômicas**, São Paulo, v.23 , n.10, 1993.
58. PUZZI, D. **Abastecimento e armazenamento de grãos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1986. p 191-223.
59. RAMBO, G.W.; TUIITE, J.; CALDWELL, R.W. *Aspergillus flavus* and aflatoxin in preharvest corn Indiana in 1971 and 1972. **Cereal Chemistry**, v. 51, p. 848-53, 1974.
60. RANJAN, K.S.; SINHA, A.K. Occurrence of mycotoxigenic fungi and mycotoxins in animal feed from Bihar, India. **J. Sci. Food Agric.** v.56, p.39-47, 1991.
61. SALDAÑA, W.; LAYZA, C. Hongos toxinogenos en maiz: aislamiento, identificacion y verificacion de su accion toxica. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE LOS ALIMENTOS, 4, 1996. **Libro de Resumenes**. Lima, 1996. p. 12.

62. SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; *et al.* **Introduction to food-borne fungi**. 4 ed. Baar: Centralalbureau voor schimmelcultures, 1995. cap.1, p. 3-235.
63. SANCHIS, V.; BALCELLS, X.; TORRES, M.; *et al.* A survey of aflatoxins and aflatoxigenic *Aspergillus flavus* in corn-based products from the Spanish market. **Microbiol. Res.** v. 150, p. 437-40, 1995.
64. SAUER, D.B.; STOREY, C.L.; ECKER, O.; *et al.* Fungi in U.S. export wheat and corn. **Phytopathology**, v. 72, n. 11, p. 1449-52, 1982.
65. SAUER, D.B.; STOREY, C.L.; WALKER, D.E. Fungal populations in U.S. farm-stored grain and their relationship to moisture, storage time, regions, and infestation. **Phytopathology**, v. 74, n. 9, p. 1050-53, 1984.
66. SCHMIDT, R.; MONDANI, j.; ZIEGENHAGEN, E. ; *et al.* High-performance liquid chromatography of the mycotoxins sterigmatocystin and its application to the analysis of mouldy rice for sterigmatocystin. **Journal of chromatography**, v. 207, p. 435-438, 1981.
67. SINHA, K.K. Incidence of mycotoxins in maize grains in Bihar State, India. **Food additives and contaminants**, v.7, n.1, p. 55-61, 1990.
68. SINGH, K. ; FRISVAD, J.C.; THRANE,U.; *et al.* **An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and**

their mycotoxins. Denmark: Institute of Seed Pathology for Developing Countries, 1991.

69. SMITH, J.E.; SOLOMONS, G.; LEWIS, C.; *et al.* Role of mycotoxins in human and animal nutrition and health. **Natural toxins**, v.3, n. 87, p. 187-192, 1995.
70. SMITH, J.E.; MOSS, M.O. **Mycotoxins:** formation, analysis and significance. Chichester: Ed. John Wiley & Sons, 1985. p. 147.
71. STELLA, M.M.; MARTÍNEZ, A. Detecção de mohos y niveles de aflatoxinas y fumosinas en maíz cultivado en Venezuela y su destrucción por amoníaco. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICOTOXICOLOGIA, 1 e ENCONTRO NACIONAL MICOTOXINAS, 8. **Anais**, Rio de Janeiro, 1994. p.81- 82.
72. TOSELLO, G.A. Milhos especiais e seu valor nutritivo. In: Paterniani, E.; Viégas, G.P. (Eds.) **Melhoramento e produção do milho**, I. 2 ed. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 375-403.
73. VALLADARES, L.L. Micotoxinas y micotoxicosis. I. aflatoxinas. **Alimentos**, v.10, n.3, p.32-40, 1985.
74. WETZEL, M.M.V. da S. Fungos do armazenamento. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V. da S. (Eds.). **Patologia de sementes**, Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 260-275.