

Milho recém-colhido no Brasil: interação da microbiota fúngica, fatores abióticos e ocorrência de fumonisinas

Pre-harvest corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and fumonisins occurrence

RIALA6/1009

Adriana P. de ALMEIDA^{1*}; Myrna SABINO¹; Homero FONSECA²; Benedito CORRÊA³

* Endereço para correspondência: ¹ Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Química Biológica, Av. Dr. Arnaldo, 355 CEP 01246-902, São Paulo/SP, Brasil e-mail: maedri@uol.com.br

² Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba, SP.

³ Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo, SP.

Recebido: 25/10/2004 – Aceito para publicação: 30/06/2005.

RESUMO

O milho, no Brasil, tem um importante papel, tanto na nutrição humana quanto animal. Atualmente, o país é o terceiro maior produtor mundial, após Estados Unidos e China, tendo sua produção ficado, nos últimos anos, em torno de 48,3 milhões de toneladas. Em termos de distribuição geográfica, o milho é cultivado em diversas regiões do país, sendo a região Centro-Sul responsável por mais de 95% da produção. A importância não se restringe apenas ao seu volume, mas também ao papel sócio-econômico desempenhado, cuja produção e comercialização sustenta centenas de milhares de pessoas. A contaminação do milho por espécies de *Fusarium*, na etapa de pré-colheita, tem sido um problema sério em vários países. Espécies pertencentes a esse gênero possuem ampla distribuição na natureza e produzem micotoxinas, metabólitos secundários tóxicos. O fato, ressalta a importância de se compreender os processos de contaminação do milho brasileiro por *F. verticillioides*, principal espécie produtora de fumonisinas, visando o desenvolvimento de estratégias de controle capazes de minimizar as perdas econômicas e possíveis problemas à saúde humana e animal. A revisão propõe fornecer informações atuais sobre a microbiota fúngica de grãos de milho recém-colhido e sua interação com os fatores abióticos e presença de fumonisinas. **Palavras-Chave.** fumonisinas, grãos de milho, microbiota fúngica, fatores abióticos.

ABSTRACT

In Brazil, corn plays an important role in both human and animal nutrition. Brazil has been ranked as the third world corn producer following the USA and China. Lately, the Brazilian annual corn yield reached 48.3 tons. The Central-Southern region is the major corn producer, responding for 95% of the total national production. The importance of corn production is not restricted to its volume, but also due to the social-economical role played by this culture, which production and trade have been employing a thousand people. Pre-harvest contamination of corn by *Fusarium* species has been a serious problem in several countries. Fungi belonging to this genus are ubiquitous in nature, and they are able to produce toxic secondary metabolites named mycotoxins. This fact emphasizes the importance in understanding the process of fungal contamination of field corn with *Fusarium verticillioides*, which is the main fumonisins - producer species, so as to develop the efficient control strategies, and to reduce economic losses and the possible human and animal health harms. The purpose of the present review is to provide up-to-date available news on the pre-harvest Brazilian corn mycoflora, and its interaction with abiotic factors and fumonisins occurrence.

Key Words. fumonisins, corn grains, mycoflora and abiotic factors

SUMÁRIO

Introdução	2
Importância do Milho	2
Panorama Nacional	2
Microbiota Fúngica do Milho	3
Fatores Abióticos	5
Fumonisinas	5
Conclusão	7
Referências	7

INTRODUÇÃO

Os cereais são susceptíveis à contaminação e à proliferação de microrganismos provenientes de vegetais, solo e veiculados pelo ar, cujo número e tipo de microrganismos diferem conforme o estágio e maturação do grão.

O armazenamento e a manipulação inadequados desses cereais conduzem à perda de qualidade caracterizada pelo aumento da susceptibilidade ao ataque de fungos, insetos, ácaros, bem como perda dos nutrientes. Os altos índices de contaminação têm sido freqüentes em regiões tropicais e subtropicais, embora também sejam freqüentes em regiões de clima temperado, não ocorrendo região do mundo isenta de contaminação microbiana.

Segundo Ominski et al.¹, os fungos representam a segunda maior causa de deterioração e perda de sementes e grãos armazenados, perdendo apenas para os insetos. Diversos fungos contaminam os grãos de milho no campo, entretanto as espécies do gênero *Fusarium* predominam no processo, sendo apontado como principal contaminante de grãos de milho em desenvolvimento no campo². O gênero *Fusarium* é reconhecidamente um importante contaminante do milho. A necessidade de 20 % a 21 % de umidade e atividade de água entre 0,80 e 0,90 para o desenvolvimento, justifica sua classificação como fungo de campo. Entretanto, este fungo pode sobreviver por meses em grãos armazenados constituindo-se em risco potencial oriundo de caráter micotoxigênico³.

Esta revisão traz informações atualizadas sobre a microbiota fúngica de grãos de milho recém-colhido e sua interação com os fatores abióticos e presença de fumonisinas.

IMPORTÂNCIA DO MILHO

O milho (*Zea mays L.*) é uma planta de ciclo vegetativo variado, evidenciando desde cultivares extremamente precoces, cuja polinização pode ocorrer 30 dias após a emergência, até cultivares normais, cujo ciclo vital pode alcançar 300 dias. Contudo, nas condições brasileiras, a cultura do milho apresenta ciclo variável entre 110 e 180 dias, em função da caracterização dos cultivares, período este compreendido entre a semeadura e a colheita⁴.

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 Argentina⁵.

O milho constitui um dos principais insumos para o segmento produtivo, sendo utilizado com destaque no arraçamento de animais, em especial na suinocultura, na avicultura e na bovinocultura de leite, tanto *in natura*, como na forma de farelo, ração ou silagem. Na alimentação humana, o milho é comumente empregado *in natura* como milho verde, e na forma de subprodutos, como pão, farinha e massas. Na indústria, é empregado como matéria-prima para produção de amido, óleo, farinha, glicose, produtos químicos, rações animais e na elaboração de formulações alimentícias, com crescentes pesquisas revelando novas utilidades⁶.

A diversidade na utilização resulta em amplo consumo de milho, seja pelos países produtores como importadores. Estima-se que nos países desenvolvidos, o consumo anual de grãos atinja 1000 kg / habitantes, sendo 930 kg consumidos indiretamente, na forma de ração para produção de carne e leite e 70 kg, diretamente, na dieta humana. Já, nos países pobres da Ásia, o consumo *per capita* é de 150 kg, quase todo na forma de grãos *in natura*⁷.

A necessidade de aumento da produtividade submeteu o milho a um intenso processo de melhoramento genético, resultando em diversos híbridos comerciais desenvolvidos especialmente para locais específicos e regionais.

Em termos de produção, a qualidade do milho depende de variedade e práticas culturais. Todos os grãos e cereais são expostos, tanto no campo quanto no armazenamento, à ação de fatores físicos, químicos e biológicos, que interagem entre si favorecendo os processos de deterioração. A manutenção adequada do cereal, durante o período de entressafra, permite a conservação das características organolépticas e nutricionais, preservando assim a qualidade do produto⁸.

PANORAMA NACIONAL

No Brasil, a importância do milho na alimentação humana e animal antecede à instalação dos colonizadores, sendo

cultivado e utilizado pelos indígenas. Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, após Estados Unidos e China, tendo sua produção ficado, nos últimos anos, em torno de 48,3 milhões de toneladas⁹.

Em termos de distribuição geográfica, o milho aparece nos quatro cantos do país, sendo a região Centro-Sul responsável por mais de 95 % da produção⁶. A importância não se restringe apenas ao seu volume, mas também ao papel sócio-econômico desempenhado, cuja produção e comercialização sustenta centenas de milhares de pessoas¹⁰.

O estado do Paraná é o principal produtor de milho do país. Somando-se as duas safras (normal e milho safrinha), o estado colheu 14,403 milhões de toneladas, com um crescimento de 46% em relação à safra anterior. De acordo com o Deral, Departamento de Economia Rural da Secretaria da Agricultura, o estado do Paraná foi responsável por 30 % da produção nacional. Os fatores responsáveis pela obtenção da safra recorde foi o clima adequado que beneficiou as lavouras, bem como o investimento dos produtores em tecnologia⁹.

No estado de São Paulo o milho é uma das mais importantes culturas, ultrapassando 1,3 milhões de hectares cultivados, tendo sido superado, em termos de área, a partir da década de 80, pelo cultivo da cana-de-açúcar¹¹.

A produção brasileira de milho em grãos tem dois destinos. Primeiro, o consumo no estabelecimento rural e, segundo a oferta do produto no mercado consumidor, onde tem-se fluxos de comercialização direcionados às fabricas de ração, indústrias químicas, produto *in natura* e exportação¹². A suinocultura e a avicultura são os responsáveis pela maior parte da utilização dos grãos (41 %), onde o milho entra como matéria-prima básica na formulação de rações destinadas a essa criação. O restante da produção divide-se entre a indústria (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 (24,7 %), ao consumo humano nas grandes cidades (4,4 %) e às perdas durante a colheita e armazenamento do total produzido no país (9,9 %)¹³.

Como todo produto agrícola, a disponibilidade do milho está sujeita a períodos de safra e entressafra, ao contrário de seu consumo, que é contínuo. Em se tratando de uma cultura anual, faz-se, então, necessário a sua conservação em armazéns para que o mercado seja abastecido nesses períodos. Portanto, no Brasil, a conservação do milho é de interesse fundamental, devido, não somente à sua intensa utilização, mas também pelo fato de sua produção restringir-se a um curto período e o seu abastecimento ocorrer durante todo o ano.

O interesse na melhor e mais prolongada conservação do grão é tanto maior quanto mais numerosos forem os agentes naturais que cooperam para sua deterioração e quanto mais fácil for a sua proliferação. Inúmeros fatores podem influenciar no processo de deterioração, como a variedade da semente utilizada no plantio, as condições climáticas desfavoráveis na colheita, os danos mecânicos, a secagem inadequada e o armazenamento impróprio¹⁴.

Apesar da deterioração dos grãos ser um fenômeno irreversível, progressivo e dificilmente evitado, o uso de práticas adequadas de cultivo, processamento e armazenamento, contribuem para o retardamento do processo⁸. No Brasil, país de grande dimensão territorial, os índices de perdas tendem a ser maiores devido à dispersão da produção, à distância dos mercados e portos de exportação e à deficiência da rede de armazenagem, em termos de adequação e localização¹⁵.

MICROBIOTA FÚNGICA DO MILHO

A contaminação fúngica tem sido responsável pela inevitável perda de qualidade dos grãos e sementes, tornando-os impróprios para o consumo e resultando em grandes perdas econômicas.

Os fungos causam uma série de danos aos grãos durante o plantio e a colheita, bem como no armazenamento. Os efeitos da invasão fúngica incluem a diminuição do poder germinativo, emboloramento visível, descoloração, odor desagradável, perda de matéria seca, aquecimento, cozimento, mudanças químicas e nutricionais, perda da qualidade e produção de micotoxinas³.

Os fungos presentes nos grãos de cereais são, tradicionalmente, classificados conforme suas exigências de água em dois grupos ecológicos: fungos de campo e fungos de armazenamento. Os primeiros invadem as sementes ainda no campo e requerem, para o desenvolvimento, elevada umidade relativa do ar (90 %) e altos teores de umidade nos grãos (20-21 %). Neste grupo, predominam as espécies dos gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium* e *Fusarium*. Quanto aos fungos de armazenamento, necessitam de teores de umidade mais baixos, entre 13 e 18%, sendo pouco freqüentes durante o crescimento da planta no campo e nos grãos recém-colhido. Neste grupo, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os principais representantes^{3,16}.

No entanto, esta classificação não é apropriada aos trópicos úmidos, uma vez que determinadas espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, anteriormente consideradas como fungos de armazenamento, podem ocorrer antes da colheita e produzir micotoxinas¹⁷.

De todos os fungos capazes de contaminar os grãos de milho no campo, as espécies do gênero *Fusarium* são as mais freqüentes. Mills² menciona o gênero *Fusarium* como importante contaminante de grãos em desenvolvimento no campo, causando doenças como, podridão da semente e colmos.

As espécies fúngicas predominantes do gênero *Fusarium* no campo são, *F. verticillioides* e *F. subglutinans*, freqüentemente responsáveis pelo apodrecimento da espiga de milho, cuja contaminação pode ser iniciada através de danos causados por insetos e aves. Estes fungos aparecem contaminando o grão junto ao embrião, embora muitas vezes os sinais desta contaminação não possam ser evidenciados¹⁸.

Em milho, duas rotas são postuladas para a contaminação por *Fusarium*. Na primeira, os esporos,

provenientes da safra anterior ou de ervas daninhas, capins e solo, caíam sobre as sementes expostas e a colonização ocorreria dentro da faixa adequada de umidade e temperatura. Na segunda, insetos ou pássaros danificariam os grãos, e os esporos fúngicos, trazidos pelo vento, caíam sobre a semente exposta promovendo a sua contaminação, sendo, neste caso, a umidade um fator não tão importante². Trabalhos recentes apontam a segunda rota como a mais provável. No entanto, independente de como o fungo penetre na planta, condições climáticas serão necessárias para que a colonização prossiga. A resistência do cultivar, após iniciada a invasão, é outro fator que não pode ser esquecido¹⁹.

A contaminação do milho recém-colhido por *Fusarium* spp. tem sido um problema sério em muitos países. De acordo com estimativas do “World Bank Report – Investing in Health”²⁰, intoxicações crônicas por micotoxinas tendem a reduzir a expectativa de vida nos países em desenvolvimento. O fato enfatiza a importância da compreensão da evolução da contaminação fúngica, nos campos de cultivo do milho, por *F. verticillioides*.

Abbas et al.²¹ isolaram *Fusarium* spp. em grãos de milho provenientes de 32 campos produtores em Minnesota (E.U.A.), tendo como espécies predominantes: *F. graminearum* (30 %), *F. subglutinans* (23 %), *F. verticillioides* (20 %), *F. oxysporum* (14 %) e *F. proliferatum* (12 %).

Snijders²² demonstrou que a frequência de aparecimento de cada espécie é influenciada pela localização geográfica e clima. Na África do Sul, esta influência foi bem demonstrada por Marasas et al.²³. Neste trabalho os autores verificaram a incidência de espécies de *Fusarium* em três áreas daquele país. O *F. verticillioides* 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.

Julian et al.²⁴, analisando 69 amostras de grãos de milho recém-colhido e armazenado de 4 regiões de Honduras, observaram que os fungos mais frequentemente isolados foram: *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans*, *Penicillium* spp., *Stenocarpella maydis*, *Stenocarpella macrospora* e *Acremonium* spp.

Gonzalez et al.²⁵, estudando a microbiota de grãos de milho recém-colhido (safra 1999 e 2000) provenientes das províncias da região nordeste dos Andes, Argentina, observaram que o gênero *Fusarium* foi o mais frequente. A espécie *F. verticillioides* foi a mais frequentemente isolada dos grãos de milho provenientes da safra de 1999 em todas as províncias, enquanto que a espécie *F. graminearum* foi a mais frequente nas amostras de milho da safra de 2000 na província de Salta.

Ghianian et al.²⁶, analisando amostras de grãos de milho recém-colhido das províncias de Fars, Khuzestan, Kermanshah e Mazandaran, Irã, verificaram que o gênero mais frequentemente isolado foi *Fusarium* spp. (38, 5%), seguido dos gêneros

Aspergillus (8,7 %), *Rhizopus* (4,8 %), *Penicillium* (4,5 %) e *Mucor* (1,1 %). *F. verticillioides* foi a espécie mais prevalente (83 %), tendo aparecido em alta incidência na província de Mazandaran (59 %), região com os maiores índices de chuva e umidade relativa, alta taxa de câncer de esôfago e altos níveis de fumonisina em milho.

No Brasil, *Fusarium* spp. são contaminantes comuns em grãos de milho e outros produtos agrícolas, com predominância de *F. verticillioides* e *F. graminearum*²⁷.

Meirelles et al.²⁸, analisando 38 amostras de grãos de milho envolvidos com surtos de leucoencefalomalácia equina – LEME, detectaram 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. verticillioides* (82 %) foi a mais prevalente.

Xavier et al.²⁹, analisando grãos de milho relacionados com o quadro de LEME, verificaram que 49,4 % das amostras estavam contaminadas por *F. verticillioides*, 25,8 %, por *Aspergillus* spp. e 25,8 %, por *Penicillium* spp.

Leoni; Soares³⁰, através do estudo de 18 amostras de milho recém-colhido, safra 1992, provenientes de diferentes municípios de São Paulo, observaram contaminação por *Fusarium* spp. em 14 a 18 % das amostras.

Pozzi et al.³¹, analisando 130 amostras de grãos de milho recém-colhido e armazenado, provenientes de Ribeirão Preto/SP, verificaram maior frequência de *Fusarium* spp. (83,8 %), seguido por *Penicillium* spp. (55,3 %), *Aspergillus* spp. (40,7 %) e outros 11 fungos filamentosos. Dentro dos gêneros *Fusarium* e *Aspergillus*, as espécies predominantes foram *F. verticillioides* (80,7 %) e *A. flavus* (36,1 %), respectivamente.

Castro et al.³², estudando 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*.

Ono et al.³³, estudando os efeitos das condições climáticas na ocorrência de fungos e fumonisinas em 150 amostras de milho recém-colhido provenientes das regiões centro-sul, centro-oeste e norte do estado do Paraná, verificaram uma elevada contaminação dos grãos por *Fusarium* spp. (98,7 a 100 %) e *Penicillium* spp. (93 a 100 %). A maior contaminação ocorreu nas amostras de grãos de milho provenientes da região centro-oeste. Nessa região a espécie *F. verticillioides* foi a predominante, tendo sido isolada em 85,9 % das amostras.

Orsi et al.³⁴, analisando 195 amostras de três híbridos de milho recém-colhido e armazenado, provenientes de Ribeirão Preto/SP, relacionaram a influência dos fatores abióticos na frequência de isolamento da microbiota fúngica. As análises microbiológicas demonstraram a predominância do gênero *Fusarium*, seguido dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Com relação ao gênero *Fusarium*, a espécie *F. verticillioides* foi a mais frequente nos 3 híbridos, principalmente na faixa de 0,70 a 0,79 de atividade de água.

Almeida et al.³⁵, estudando 66 amostras de grãos de milho recém-colhido (híbridos BR-201, C-901 e CX-322), provenientes das regiões de Assis, Capão Bonito e Ribeirão Preto, verificaram que o gênero *Fusarium* apareceu contaminando 80,0 % das amostras na região de Assis, 55,5 % das amostras na região de Capão Bonito e 77,8 % das amostras na região de Ribeirão Preto. A espécie *F. verticillioides* foi a mais freqüentemente isolada, tendo aparecido em 60,6% das amostras.

Almeida et al.³⁶, analisando 57 amostras de grãos de milho colhidas em diferentes estádios de maturidade da planta, também verificaram maior freqüência de *F. verticillioides* nas amostras analisadas. Tal fungo foi isolado em 35 % das amostras da região de Capão Bonito e em 49 % das amostras de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. Nesse mesmo trabalho, verificaram, ainda, uma contaminação prévia por *F. verticillioides* em 30 % das sementes utilizadas para o plantio.

Ono et al.³⁷, estudando os efeitos do armazenamento em 36 amostras de grãos de milho com teor de umidade de 11 e 14 %, verificaram que os gêneros *Fusarium* e *Penicillium* predominaram nas amostras de milho recém-colhido (100 %) e em amostras armazenadas por 12 meses em ambos teores de umidade avaliados.

FATORES ABIÓTICOS

O meio ambiente de uma cultura de milho é um complexo difícil de ser conhecido, devido ao seu dinamismo e constantes variações. Porém, seu importante papel no desenvolvimento e produção de plantas não permite que seja desprezado, quando se quer maximizar a produção agrícola³⁸.

Mossel; Ingram³⁹ classificaram os fatores que influenciam o desenvolvimento fúngico em: (a) intrínseco, relacionado diretamente com o substrato (conteúdo de água, pH, conteúdo nutricional, características genéticas) e (b) extrínsecos, relacionados com o meio ambiente (temperatura, umidade relativa do ambiente, chuva e outros).

A cultura do milho é uma das mais estudadas sob o ponto de vista de suas exigências climáticas, devido ao grande interesse despertado para sua produção no século XIX. O milho é uma planta que exige, durante seu ciclo vegetativo, calor e umidade para produzir satisfatoriamente, proporcionando rendimentos compensadores³⁸.

De todos os fatores que influenciam o desenvolvimento fúngico em grãos de milho, a água e temperatura são, provavelmente, os mais importantes determinantes ecológicos. A atividade de água (Aa) e temperatura influenciam, diretamente, nas interações com outros fungos, habilidade em produzir esporos e nas atividades metabólicas, principalmente na produção de micotoxinas⁴⁰.

A maioria dos fungos que contaminam os grãos se proliferam em teores de umidade acima de 13,5 %, sendo a atividade de água para o crescimento das principais espécies de

fungos toxigênicos acima de 0,76⁴¹. Segundo esses mesmos autores os valores mínimos de atividade de água para o crescimento de *F. moniliforme* e produção de fumonisinas são 0,87 e 0,90, respectivamente.

A maioria dos fungos que contaminam os grãos, antes da colheita, é capaz de crescer dentro de limites mais amplos de pH, pressão osmótica, conteúdo de umidade, bem como, de se desenvolver em temperaturas entre 0 °C e 30 °C. Entretanto, alguns podem crescer a 35 °C e outros, próximo à temperatura de congelamento, como é o caso de certas espécies de *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Thamnidium*⁴².

Le Bars et al.⁴³, estudando o efeito da temperatura na produção de fumonisinas por cepas de *F. verticillioides* obtidas de grãos de milho, observaram que a temperatura de 20 °C é a melhor para a produção de fumonisin B₁, sendo que a temperaturas de 5, 35 e 40 °C, nenhuma fumonisin foi detectada.

Cahagnier et al.⁴⁴ analisando o efeito da Aa na biossíntese da fumonisin B₁ (FB₁) e no crescimento de *F. verticillioides*, verificaram que a maior produção da toxina (3000 µg/g) ocorreu em valores de Aa próximos a 1,0.

Marin et al.⁴⁵, estudando 3 cepas de *F. proliferatum* e 1 de *F. verticillioides* isoladas de grãos de milho provenientes da Espanha, constataram maior produção de fumonisinas B₁ e B₂ nas cepas isoladas de grãos de milho com Aa 0,956 e 0,968. Verificaram, ainda, que as cepas isoladas de grãos de milho com Aa 0,925 produziram baixos níveis de fumonisinas.

Marin et al.⁴⁶ verificou o efeito da atividade de água (0,89 a 0,97) e temperatura (7 a 37°C) na produção de FB₁ por cepas de *F. verticillioides* e *F. proliferatum* isoladas de grãos de milho irradiados e incubados por 28 dias. As condições ótimas de produção de FB₁ para *F. verticillioides* e *F. proliferatum* foram 30 °C e Aa 0,97 e 15 °C e Aa 0,97, respectivamente. Nenhuma FB₁ foi produzida por cepas de *F. verticillioides* e *F. proliferatum* isoladas de grãos de milho com Aa entre 0,89 e 0,91.

Torres et al.⁴⁷, estudando os efeitos da Aa (0,92, 0,95 e 0,98) e temperatura (20 e 30 °C) no crescimento miceliano de *F. verticillioides*, *A. ochraceus* e *Alternaria alternata* em grãos de milho, verificaram que *F. verticillioides* demonstrou um comportamento distinto frente aos valores de atividade de água e temperatura testados, ao contrário dos outros fungos estudados.

FUMONISINAS

As fumonisinas são metabólitos fúngicos secundários originalmente isolados de *F. verticillioides*, que tem como principal característica a sua presença natural em alimentos, principalmente em milho^{48,49}.

Até o presente momento, 28 diferentes análogas às fumonisinas (FB) foram descritas. Destas, as fumonisinas B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) e B₃ (FB₃) são produzidas naturalmente. A FB₁ é a mais importante do grupo, constituindo até 70 % do total das

fumonisinias, tanto em cultivo quanto em milho naturalmente contaminado^{50,51}.

Essa micotoxina causa leucoencefalomalácia em equínos – LEME⁵²⁻⁵⁴, edema pulmonar e hidrotórax em suínos – EPS^{55,56}, câncer hepático em ratos⁵⁷, além de, redução do desenvolvimento, problemas cardíacos, imunossupressão, degeneração e necrose hepática em aves⁵⁸. Embora ainda não seja constatada, a elevada incidência de câncer de esôfago, em determinadas regiões da África do Sul, China, Itália e Estados Unidos, tem sido relacionada a provável consumo de alimentos contendo elevados níveis de fumonisinas⁵⁹⁻⁶¹. Outro sim, a “International Agency for Research on Cancer” – IARC classificou as toxinas de *F. verticillioides* como pertencentes a Classe 2B, provavelmente carcinogênicas a seres humanos⁶².

As fumonisinas são elaboradas a partir de uma estrutura que é característica da esfinganina, um composto intermediário na biossíntese dos esfingolipídeos⁶³. Essa semelhança das fumonisinas com a molécula de esfinganina leva alguns autores a acreditarem que o seu mecanismo de ação esteja relacionado com a inibição ou quebra do metabolismo dos esfingolipídeos⁶⁴, estrutura essa relacionada com várias funções da célula, tais como: comunicação célula-célula, e crescimento, diferenciação e transformação da célula. Portanto, uma quebra na seqüência da biossíntese desses esfingolipídeos poderia trazer graves conseqüências, com transtornos orgânicos⁶⁵.

A potente ação da fumonisina sobre a biossíntese dos esfingolipídeos talvez seja o mecanismo das lesões necróticas nos cérebros de equínos intoxicados por FB₁. As lesões do tecido cerebral, que é rico em esfingolipídeos, podem ser o resultado final da inibição da síntese de esfingomiéline. A inibição dos esfingolipídeos, é específica, e o sítio de ação parece estar na ceramida sintetase, que catalisa a última etapa da síntese, quando o grupo amina da esfingosina é acilado por um acil-CoA graxo, de cadeia longa. Essa seria a forma pela qual a fumonisina causaria a leucoencefalomalácia equina em equínos (LEME) e tumor em ratos⁶⁶.

As fumonisinas foram primeiramente isoladas de culturas de *F. verticillioides*, porém, outros *Fusarium* spp. tem sido demonstrados como produtores de fumonisinas, como é o caso do *F. proliferatum*⁶⁷, *F. nygamai*⁶⁸, *F. anthophilum*, *F. dlamini* e *F. napiforme*⁶⁹. Recentemente, uma espécie do gênero *Alternaria* também foi demonstrada como sendo produtora de FB₁⁷⁰.

F. verticillioides, principal espécie produtora de fumonisinas, ocorre comumente no milho e em outros cereais como trigo, arroz e aveia, assim como em menor freqüência, em outras culturas não agrícolas. Essa espécie tem larga distribuição na natureza e não ocorre somente em zonas tropicais e subtropicais, mas também, em zonas temperadas úmidas e sub-úmidas⁷¹.

A primeira descrição sobre a ocorrência natural de FB₁ foi realizada por Sydenham et al.⁷², a partir de milho contaminado de uma área de Transkei, África do Sul, com altos índices de câncer de esôfago em humanos. Os níveis detectados nas amostras variavam de 44 a 83 µg/g.

Murphy et al.⁷³ determinaram o conteúdo de fumonisinas em milho e respectivo refugo das safras 1988 a 1991 provenientes de Iowa, Wiscosin e Illinois, Estados Unidos. Neste trabalho verificaram que a concentração de fumonisinas no refugo de milho foi 10 vezes maior que no milho intacto.

Julian et al.⁷⁴ constataram a presença de FB₁ em 24 das 66 amostras de milho provenientes de Honduras, em níveis que variaram de 0,068 a 6,55 µg/g.

Fazekas et al.⁷⁴, analisando grãos de milho provenientes da Hungria, verificaram que 70% das amostras, contaminadas visualmente por *Fusarium*, apresentavam uma média de 6,64 µg/g de FB₁ (0,095 a 52,4 µg/g). Neste mesmo trabalho, os autores verificaram que o restante das amostras (30%), que não apresentavam contaminação visual por nenhum fungo, também estavam contaminadas por FB₁, em níveis que variaram de 0,06 a 5,1 µg/g.

Yoshizawa et al.⁷⁵, analisando 18 amostras de milho tailandês, safra 92/93, detectaram FB₁ em 89% das amostras (0,063 a 18,8 µg/g) e FB₂ em 67% (0,05 a 1,4 µg/g).

No Brasil, vários trabalhos relataram a ocorrência de fumonisinas B₁ e B₂ em amostras de grãos de milho, derivados e rações, procedentes de estabelecimentos com histórico de LEME e outros tipos de intoxicações⁷⁶⁻⁷⁸.

Hirooka et al.⁷⁹, analisando 48 amostras de milho do Paraná, Mato Grosso e Goiás, detectaram fumonisinas B₁ e B₂ na totalidade das amostras, com níveis de 0,6 a 18,52 µg/g de FB₁ e de 1,2 a 19,13 µg/g de FB₂.

Ono⁸⁰, analisando 150 amostras de milho recém-colhido das safras de 1995/96, detectou FB₁ em 149 amostras, com níveis de 0,07 a 13,46 µg/g e FB₂ em 140 amostras, com níveis variando de 0,08 a 6,92 µg/g.

Em 4 locais do Estado de São Paulo (Assis, Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga), Machinski Jr⁸¹ pesquisou a ocorrência de fumonisinas em três híbridos de milho recém-colhido – safra 94/95. Todos os híbridos analisados mostraram uma contaminação por FB₁ e FB₂, variando de 0,23 a 15,96 µg/g para FB₁ e de 0,13 a 7,01 µg/g para FB₂.

Camargos⁸², analisando amostras de milho recém-colhido - safras 1994/95 e 1997/98, provenientes das regiões de Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, verificou que todos os cultivares analisados estavam contaminados com fumonisinas em níveis que variaram de 0,13 a 6,58 µg/g para FB₁ e de 0,06 a 2,15 µg/g para FB₂ - safra 1994/95, e de 1,15 a 43,8 µg/g para FB₁ e de 0,08 a 11,65 µg/g para FB₂ - safra 97/98.

Orsi et al.³⁴, estudando 195 amostras de três híbridos de milho recém-colhido e armazenado, provenientes de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, verificaram que 90,2% das amostras apresentaram-se contaminadas por FB₁ (0,87 a 49,31 µg/g) e 97,4% por FB₂ (1,96 a 29,16 µg/g).

Ono et al.⁸³, analisaram 150 amostras de milho recém-colhido provenientes das regiões centro-sul (27 amostras), centro-oeste (86 amostras) e norte (37 amostras) do Estado do Paraná. Fumonisinias foram detectadas em 147 (98%) amostras com níveis variando de 0,096 a 22,6 µg/g. Os maiores níveis de

contaminação foram encontrados nas amostras provenientes das regiões norte (9,85 µg/g) e centro-oeste (5,08 µg/g).

Almeida et al.³⁶ verificaram a contaminação em 57 amostras de grãos de milho, provenientes das regiões de Capão Bonito e Ribeirão Preto nos diferentes estádios de maturidade da planta por fumonisinas B₁ e B₂. Os resultados de Capão Bonito mostraram 92,3% de contaminação das amostras por FB₁ (0,05 a 10,87 µg/g) e 61,5% por FB₂ (0,05 a 0,521 µg/g). Nas amostras provenientes da região de Ribeirão Preto essa análise revelou que 96,8% das amostras estavam contaminadas por FB₁ (0,05 a 17,685 µg/g) e 74,2% por FB₂ (0,05 a 5,238 µg/g).

Ono et al.⁸⁴ analisando 128 amostras de milho recém-colhido provenientes das regiões norte (safras 1991, 1995 e 1997) e centro-sul (safra de 1995), do Estado do Paraná, verificaram que 111 (86,7%) apresentaram-se contaminadas por fumonisinas. Todas as 27 (100%) amostras de grãos de milho, provenientes da região norte (safra 1991) apresentaram contaminação por fumonisinas (2,32 a 16,64 µg/g). Na região centro-sul (safra 1995), 26 (96,3%) amostras de um total de 27, foram positivas para fumonisinas (0,07 a 3,66 µg/g), enquanto que na região norte (safra 1995) todas as 37 (100%) amostras, apresentaram contaminação por fumonisinas (0,57 a 9,97 µg/g). Na região norte (safra 1997) das 37 amostras de grãos de milho analisadas, 21 (56,7%) apresentaram contaminação por fumonisinas, porém com níveis mais baixos (0,05 a 2,67 µg/g).

CONCLUSÃO

Os avanços na área da tecnologia agrícola permitiram um aumento da produção mundial de alimentos. Entretanto, determinados fatores climáticos e biológicos tem limitado a capacidade agrícola de alguns países, afetando direta ou indiretamente os produtos durante o plantio, a colheita e o armazenamento. Em termos de produção, a qualidade do milho depende muito de sua variedade e práticas culturais. Sabemos que todos os grãos são expostos, tanto no campo quanto no armazenamento, à ação de fatores físicos, químicos e biológicos, que interagem entre si favorecendo os processos de deterioração, que podem acarretar perdas substanciais na economia e alto risco à saúde humana e animal. A manutenção adequada das culturas durante o plantio, bem como dos grãos, durante o período de entressafra, permite a conservação das características organolépticas e nutricionais, preservando-se a qualidade do produto. Até o presente momento pouco se sabe a respeito de como e quando se dá a contaminação do milho, tanto no campo quanto no armazenamento. Sendo o milho uma cultura de grande significado econômico, é imprescindível a elucidação dos mecanismos de contaminação, para que medidas preventivas possam ser tomadas, amenizando-se, com isso, as perdas econômicas e os riscos à saúde humana e animal.

A presença simultânea de *Fusarium verticillioides* e fumonisinas, na maioria das amostras de grãos de milho, demonstra a importância de um controle efetivo da cultura durante a fase de crescimento da mesma.

REFERÊNCIAS

1. Ominski KH, Marquardt RR, Sinha RN, Abranson, D. Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi. In: Miller JD, Trenholm HL, editors. Mycotoxins in Grains: compounds other than aflatoxins. St Paul, Eagan Press, 1994. p.287-312.
2. Mills JT. Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* species on cereal seeditors. J Food Protect 1989; 52:737-42.
3. Christensen CM, Kaufmann HH. Grain storage: The role of fungi quality loss. Minneapolis, University Minnesota Press;1969.
4. Fancelli AL. Plantas alimentícias: guia para aula, estudos e discussão. Centro Acadêmico Luiz de Queiroz. ESALQ / USP; 1986.
5. Joint,Fao/Who/ Unep. Conference on mycotoxins, Global Perspective on mycotoxins. Nairobi, WHO; 1977.
6. Bull LT, Cantarella H. Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba, Potafos, 1993.
7. Moricochi L, Ferreira CR, Vicente JR, Piva LHO. Potencial de produção e produtividade da agricultura paulista. Agricultura, São Paulo 1989; 36: 127-48.
8. Almeida Lima V. Industrialização do milho. In: Fancelli, L.A., Lima, V.A, editors. Milho: produção, pré-processamento e transformação agroindustrial. São Paulo, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1983. p.77-112.
9. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal 2003. (<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2003/default.shtm>) 25/11/04.
10. Moura PAM, Oliveira ACS Aspectos econômicos da cultura do milho. Informe Agropecuário, 6 (72) dez, 1980.
11. Nogueira-Júnior S, Nogueira EA, Tsunehiro A. Consideração sobre a agroindústria do milho. São Paulo, Instituto Econômico de Agricultura, 1987; 27, p.1-18. (Relatório de Pesquisa).
12. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. EMBRAPA Milho e Sorgo. (<http://www.cnpm.embrapa.br/index.php3>)
13. Pedrosa AVB, Dezen RB. O milho: características do mercado e perspectivas. Preços Agríc. 1991; 55: 1-4.
14. Fancelli AL. Tecnologia da Produção. In: Fancelli, LA, Lima, VA, editors. Milho - produção, pré-processamento e transformação agroindustrial. São Paulo, Secretaria da Agricultura e Comércio, Ciência e Tecnologia, 1983. p.1-68.
15. Carvalho F, Ferreira C, Tsunehiro A, Freitas S. Avaliação econômica das perdas pós-colheita de milho no Brasil. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo,18. Vitória, 1990. p.8-13.
16. Christensen CM, Sauer DB. Mycoflora: In: Christensen, C.M, editor. Storage of cereal grains and their products. Minnessota, American Association of Cereal Chemists, 1982, p.219-40.
17. Hill RA, Wilson DM, McMillian WW, Widstron NW, Cole RJ, Sanders TH, Blankenship PD. Ecology of the *Aspergillus flavus* group and aflatoxin formation in corn and groundnut. In: Lacey J ed. Trichotecenes and other mycotoxins. Chichester: Wiley J, Publisher; 1985.
18. Sutton JC. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. Can J Plant Pathol 1982; 4: 195-209.
19. Miller JD. Epidemiology of *Fusarium* ear diseases of cereals. In: Miller JD, Trenholm HL, editors. Mycotoxins in Grain. St. Paul: Eagan Press; 1994. p.19-36.
20. World Bank Report. Investing in Health. World Development Report 1993. New York, NY, Oxford University Press, 1993.
21. Abbas HK, Mirocha CJ, Meronuck RA, Pokorny JD, Gould SL, Kommedahl T. Mycotoxins and *Fusarium* species associated with infected ears of corn in Minnesota. Appl Environ Microbiol 1988; 54: 1930-3.
22. Snijders CHA. Breeding for resistance to *Fusarium* in wheat and maize. In: Miller JD, Trenholm HL, editors. Mycotoxins in Grain. St. Paul: Eagan Press; 1994. p.37-58.
23. Marasas WF, Kriek NPS, Wiggins VM, Steyn PS, Towers DK, Hastite TJ Incidence, geographic distribution and toxigenicity of *Fusarium* species South African corn. Phytopathology 1979; 69:1181-5.

24. Julian AM, Warring PW, Phillips SI, Medlock VFP, Macdonald MV, Río LE. Fungal contamination and selected mycotoxins in pre- and post-harvest maize in Honduras. *Mycopathologia* 1995; 129:5-16.
25. Gonzalez HH, Resnik SL, Pacin AM. Mycoflora of freshly harvested flint corn from Northwestern Provinces in Argentina. *Mycopathologia* 2000; 155(4):207-11.
26. Ghiasian SA, Kord-Bacheh P, Rezayat SM, Maghsood AH, Taherkhani H. Mycoflora of Iranian maize harvested in the main production areas in 2000. *Mycopathologia* 2004; 58(1):113-21.
27. Salgado JM, Carvalho PCT. Fungos toxigênicos associados a cereais. I - Levantamento da microbiota do milho, trigo e arroz. *Rev Microbiol* 1980; 11:60-3.
28. Meirelles MCA, Corrêa B, Fischman O, Gambale W, Paula CR, Chacon-Reche No et al. Mycoflora of the toxic feed associated with equine leukoencephalomalacia (ELEM) outbreaks in Brazil. *Mycopathologia* 1994; 127:183-8.
29. Xavier JG, Brunner CHM, Sakamoto M, Corrêa B, Fernandes WE, Dias JLC. Equine leukoencephalomalacia: Report of five cases. *Braz J Anim Sci* 1991; 28:185-9.
30. Leoni LAB, Soares LMV. Desenvolvimento de uma metodologia para determinação e confirmação de moniliformina em milho. In: Congresso Latino de Micotoxicologia, 1. Encontro Nacional De Micotoxinas, 8. Anais. Rio de Janeiro, 1994. p.114-15.
31. Pozzi CR, Corrêa B, Gambale W, Paula CR, Chacon-Reche NO et al. Post-harvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxins occurrence. *Food Addit Contam* 1995; 12: 313-19.
32. Castro M.F, Soares LMV, Furlani RRZ. Mycoflora, aflatoxigenic species and mycotoxins in freshly harvested corn (*Zea mays L.*): a preliminary study. *Rev Microbiol* 1995; 26: 289-95.
33. Ono EY, Sugiura Y, Homechin M, Kamogae M, Vizzoni E, Ueno Y et al. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Parana, Brazil. *Mycopathologia* 1999; 147(3):139-48.
34. Orsi RB, Corrêa B, Pozzi RC, Schammas E, Nogueira JR, Dias SMC et al. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. *J Stored Prod Res* 2000; 36:75-87.
35. Almeida AP, Corrêa B, Mallozzi MAB, Sawasaki E, Ortega EM. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. *J Braz Soc. Microbiol* 2000; 31: 321-26.
36. Almeida AP, Corrêa B, Direito GM, Fonseca H, Fancelli AL, Ortega E. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. *J Agric Food Chem* 2002; 50:3877-82.
37. Ono EY, Sasaki EY, Hashimoto EH, Hara LN, Corrêa B, Itano ES, Sugiura T, Ueno Y, Hirooka EY. Post-harvest storage of corn: effect of beginning moisture content on mycoflora and fumonisin contamination. *Food Addit Contam* 2002; 19(11):1081-90.
38. Silva WJ Aptidão climática para a cultura do milho. *Informe Agropecuário*, 6 (72) dez. 1980.
39. Mossel DA, Ingram M. The physiology of the microbial spoilage of foods. *J Appl Bacteriol* 1955; 18:232-68.
40. Lacey J Water availability and the occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in stored products. In: International Iupac Symposium On Mycotoxins And Phycotoxins, 6. Anais. Tokyo, 1988. p.186-89.
41. Lacey J, Ramakrishna N, Hamer A, Magan N, Marfleet C. Grain fungi. In: Arora DK, Mukerji KG, Marth EH, editors. *Handbook of Applied Microbiology: foods and feed*. New York: Marcel Dekker, 1991.
42. Lacey J Pre - and post - harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. In: Moss MO, Jarvis B, Skinner FA, editors. *Filamentous fungi in foods and feed*. Soc Appl Bacteriol Symp., Ser., n.18 (suppl.):145, 1989.
43. Le Bars J, Le Bars P, Dupuy J, Boudra H, Cassini R. Biotic and abiotic factors in fumonisin B₁ production and stability. *JAOAC Int*. 1994; 77(2):517-21.
44. Cahagnier B, Melcion D, Richard-Molard D. Growth of *Fusarium verticillioides* and its biosynthesis of fumonisin B₁ on maize grain as a function of different water activities. *Lett Appl Microbiol* 1995; 20:247-51.
45. Marín S, Sanchis V, Vinas I, Canela R, Magan N. Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B1 and B2 production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize grain. *Lett Appl Microbiol* 1995; 21:298-301.
46. Marín S, Magan N, Belli N, Ramos AJ, Canela R, Sanchis V. Two-dimensional profiles of fumonisin B1 production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in relation to environmental factors and potential for modelling toxin formation in maize grain. *Int J Food Microbiol* 1999; 51(2-3):159-67.
47. Torres MR, Ramos AJ, Soler J, Sanchis V, Marín S. SEM study of water activity and temperature effects on the initial growth of *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria alternata* and *Fusarium verticillioides* on maize grain. Scanning electron microscopy. *Int J Food Microbiol* 2003; 81(3):185-93.
48. Bezuidenhout SC, Gelderblom WCA, Gorst-Allman CP, Horak RM, Marasas WFO, Spiteller G et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium verticillioides*. *J Chem Soc. Chem Commun* 1988; 11:743.
49. Gelderblom WCA, Jaskiewicz K; Marasas WFO, Thiel PG, Horak RM; Vleggaar R et al. Fumonisin: novel mycotoxin with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54:1806-11.
50. Musser SM, Plattner RD. Fumonisin composition in culture of *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygamae*. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 1169-73.
51. Rheeder JP, Marasas WFO, Vismer HF. Production of fumonisins analogs by *Fusarium* species. *Appl Env. Microbiol* 2002; 68 (5): 2101-05.
52. Haliburtom JC, Vesonder RF, Lock TF, Buck WB. Equine leukoencephalomalacia (ELEM): a study of *Fusarium verticillioides* as an etiologic agent. *Vet Hum. Toxicol.* 1979; 21:348-51.
53. Marasas WFO, Kellerman TS, Gelderblom WCA, Cotzer JAW, Thiel PG, Van Der Lugt JJ Leukoencephalomalacia in horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium verticillioides*. *Onderstepoort. J Vet Res* 1988; 55:197-203.
54. Ross PF, Rice LG, Plattner RD, Osweiler GD, Wilson TM, Owens DL et al Concentrations of fumonisin B₁ in feed associated with animal health problems. *Mycopathologia* 1991; 114:129-35.
55. Calvin BM, Harrison LR. Fumonisin induced pulmonary edema and hydrotorax in swine. *Mycopathologia* 1992; 117:79-82.
56. Harrison LR, Colvin BM, Greene JT. Pulmonary edema and hydrotorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium verticillioides*. *J Vet Diagn Invest* 1990; 2:217-21.
57. Gelderblom WCA, Kriek NPJ, Marasas WFO, Thiel PG. Toxicity and carcinogenic of the *Fusarium verticillioides* metabolite, fumonisin B₁ in rats. *Carcinogenesis* 1991; 12:1247-51.
58. Norred WP, Voss KA. Toxicity and role of fumonisin in animal diseases and human esophageal cancer. *Food Protect.* 1994; 57:522-7.
59. Chu FS, Li GI. Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in mould collected from the People's Republic of China in regions with high incidence of esophageal cancer. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60:847-52.
60. Rheeder JP, Marasas WFO, Thiel PG, Sydenham EW, Shephard GS, Van Schalkwyk DJ *Fusarium verticillioides* and the fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology* 1992; 82:353-7.
61. Sydenham EW, Shephard GS, Thiel PG, Marasas WFO, Stockenstrom S. Fumonisin contamination of commercial corn-base human food stuffs. *J Agric Food Chem* 1991; 39:2014-9.
62. IARC. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon.; IARC; 1993. v.56.
63. Sweeley CC. Sphingolipids. In: Vance DE, Vance JE, editors. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, Amsterdam.; Elsevier Science Publ; 1991. p.327-61.
64. Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill Jr AM. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium verticillioides*. *J Biol Chem* 1991; 266:1486-90.

65. Merrill Jr AH. Cell regulation by sphingosine and more complex sphingolipids. *J Bioenerg Biomembr* 1991; 23: 83-104.
66. Norred WP, Wang E, Yoo H, Riley RT, Merrill Jr AH. Toxicology of fumonisins and mechanistic implications. *Mycopathologia* 1992; 117 (1-2):73-8.
67. Ross PF, Nelson PE, Richard JL, Plattner RD, Rice LG, Osweiler GD et al. Production of fumonisin by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56:3224- 6.
68. Thiel PG, Marasas WFO, Sydenham GS, Gelderblom WCA, Shepard GS. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathologia* 1992; 117:3-9.
69. Nelson PE. Taxonomy and biology of *Fusarium verticillioides*. *Mycopathologia* 1992; 117:29-36.
70. Chen J, Mirocha CJ, Xie W, Hogge L, Olson D. Production of the fumonisin B₁ by *Alternaria alternata* f. spp. *lycopersici*. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58:3928-31.
71. Bacon CW, Nelson PE. Fumonisins production in corn by toxigenic strains of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. *J Food Protect* 1994; 57:514-21.
72. Sydenham EW, Thiel PG, Marasas WF, Shephard GS, Van Schalkwyk DJ, Koch KR. 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* 1990; 38 (10):1900-3.
73. Murphy PA, Rice LG, Ross PF. Fumonisin B₁, B₂ and B₃ content of Iowa, Wisconsin, and Illinois corn and corn screenings. *J Agric Food Chem* 1993; 41:263-6.
74. Fazekas B, Kis M, Tóthné Hajdú E. Data on the contamination of maize with fumonisin B1 and other fusariotoxins in Hungary. *Acta Veterin. Hungarica* 1996; 44:27-37.
75. Yoshizawa T, Yamashita A, Chokethaworn N. Occurrence of fumonisins and aflatoxins in corn from Thailand. *Food Addit Contam* 1996; 13 (2):163-8.
76. Hirooka EY, Shibata MM, Viotti NMA, Carvalho L, Takahashi LSA, Souza IF et al. Fumonisin: importância da nova micotoxina de *Fusarium verticillioides* em intoxicações animais no norte do Paraná. *Rev Microbiol* 1991; 22(1):312.
77. Meirelles MCA, Correa B, Fischman O, Gambale W, Paula CR, Fonseca H. Leucoencefalomalácia equina (LEME) no Brasil. II. Aspectos epizootiológicos e micotoxicológicos dos surtos ocorridos nos anos de 1988 a 1990. *Rev Microbiol* 1991; 22:316.
78. Yamaguchi MM, Hirooka EY, Shibata TMM, Hasegawa RH, Aoyama S, Sugiura T et al. Fumonisin em milho no Estado do Paraná. Anais do Encontro de Micotoxinas, 7, São Paulo, 1992.
79. Hirooka EY, Yamaguchi MM, Aoyama S, Sugiura Y, Ueno Y. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. *Food Addit Contam* 1996; 13:173-83.
80. Ono EYS. Microbiota fúngica, fumonisinas e efeitos da armazenagem em milho [Tese de Doutorado]. Londrina, Paraná: Universidade Estadual de Londrina, 1999. 137pp.
81. Machinski Jr M. Micotoxinas em cultivares de milho (*Zea mays* L.) e em produtos de milho: Avaliação da ocorrência e de fatores que contribuem para a produção no campo [Tese de Doutorado]. Campinas, São Paulo: Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, 2000.
82. Camargos SM, Valente Soares LM, Sawasaki E, Sordi G, Castro JL, Bortoletto N. Incidência de fumonisinas em cultivares de milho no Estado de São Paulo [Tese de Doutorado]. Campinas, São Paulo: Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, 2000.
83. Ono EY, Ono MA, Funo FY, Medinal AE, Oliveira TC, Kawamura O et al. Evaluation of fumonisin-aflatoxin co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA. *Food Addit Contam* 2001; 18(8):719-29.
84. Ono EY, Fungaro MH, Sofia SH, Figueira EL, Gerage AC, Ichinoe M et al. Trends of fumonisin contamination and animal intoxication through monitoring 1991 to 1997 corn crop in the State of Parana, Brazil. *Mycopathologia* 2004; 158(4):451-5.