TAINAH DRUMOND DE OLIVEIRA

BIOCONTROLE PARA FUNGOS E MICOTOXINAS EM MILHO NO CAMPO

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2016

TAINAH DRUMOND DE OLIVEIRA

Biocontrole para fungos e micotoxinas em milho no campo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Benedito Corrêa

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Tainah Drumond de
Biocontrole para fungos e micotoxinas em milho no campo / Tainah Drumond de Oliveira. -- São Paulo, 2016.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientador: Benedito Corrêa.

Descritores: 1.Contaminação de alimentos 2.Agentes de controle biológico 3.Fungos 4.Zea mays 5.*Aspergillus flavus* 6.Micotoxinas

USP/FM/DBD-028/16

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

Candidato (a): Tainah Drumond de Oliveira

Título da Tese: Biocontrole para fungos e micotoxinas em milho no campo.

Orientador (a): Prof. Dr. Benedito Corrêa.

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou-o (a)

( ) Aprovado (a) **( ) Reprovado (a)**

Examinador (a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador (a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

MEDICINA

USP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CIÊNCIA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **12.07.13** tomou ciência do Projeto nº **279/13** intitulado **"Emprego de Afla-guard no controle de fungos e de micotoxinas (aflatoxinas e fumonisinas) em variedade de milho, no campo"**, vinculado à pós-graduação do Departamento de Dermatologia , que não envolverá atividade prática e/ou experimental no âmbito da Faculdade de Medicina ou Instituto do Câncer do Estado de São Paulo e que conta com prévia aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, onde o projeto será executado.

Pesquisador(a) Responsável: Benedito Corrêa

Pesquisador(a) Executante : Tainah Drumond de Oliveira

CEP-FMUSP, 12 de Julho de 2013.

Prof. Dr.Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

À minha família, exemplo de união e amor incondicional, pelos preciosos valores a mim ensinados e pelo apoio em todos os momentos da minha vida. Ao meu marido, Guilherme, pelo amor, carinho, cuidado e parceria durante esses anos de convívio. Muito amor e gratidão à vocês, seres de luz!

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Benedito Corrêa, pela confiança, orientação e dedicação depositada durante todos esses anos, desde a iniciação científica ao mestrado. Exemplo de humildade, honestidade e sabedoria. Minha eterna gratidão pela oportunidade de ter sido sua orientada!

Aos meus amados pais, Marilene e Sebastião, pelo apoio em todas as minhas decisões, durante todos os momentos da minha vida. Por serem, para mim, exemplos de caráter, força e determinação. Muitíssimo obrigada por serem quem são e, acima de tudo, por serem meus pais. Amo muito vocês!

Ao meu irmão, Thássio, pelo apoio, carinho e amizade, que mesmo estando sempre longe, nunca foi abalada. Te amo muito!

Ao meu amado marido, Guilherme, por fazer parte da minha vida, por me ensinar a ser, cada dia mais, uma pessoa melhor. Muito obrigada pelo amor, pela amizade, pelo carinho, pelo afeto, pelo convívio, pelo aprendizado mútuo e, sobretudo, por ter me escolhido para ser sua companheira por toda a vida. Te amo muito!

Às minhas queridas primas-irmãs, Liry e Ana Laura, pela amizade, amor, parceria e apoio em todos os momentos da minha vida. Por se fazerem presentes, mesmo longe, e por serem meus diamantes. Amo vocês, minhas melhores!

À minha querida prima, Taysy, sempre presente desde sempre, pelo apoio, carinho, ensinamento e por todo cuidado que tem a mim. Obrigada por tudo! Amo você!

Ao meu querido primo, Jordan, pelo amor, amizade e por ter sido imprescindível desde o momento em que cheguei em São Paulo. Obrigada por ser assim, tão doce. Te amo muito, queridíssimo!

Ao querido primo, Wanderson, pela amizade, parceria, paciência, convívio e por ter sido meu companheiro de apartamento e de aventuras por São Paulo. Obrigada, querido, por tudo!

Aos meus avós, Preta, Antônio e Eudes, pela doçura, amor e cuidado. Pelas guloseimas, mimos e por serem meus alicerces, me transmitindo paz e sabedoria durante toda a minha vida. Muito amor a vocês!

Às minhas tias-mães, Maristela, Dorinha e Márcia Adriene, por serem tão imprescindíveis para mim, por estarem sempre dispostas a me ajudar. Amo muito vocês!

À Luma e à Súrya, por me ensinar, a cada dia que passa, o significado de amor incondicional e por sempre me tirar um sorriso do rosto.

À minha família, paterna e materna, em todas as suas ramificações, minha eterna gratidão pelo amor e união que me foi passado durante toda a minha vida!

À minha amiga querida, Juliana Maia, pelas conversas e filosofias que duravam uma noite inteira, por ser tão prestativa, e pela linda amizade construída durante todos esses anos. Amo muito você!

À minha querida amiga, Ticiane Silveira, pela prazerosa convivência, pelas conversas, pelas comidas baianas deliciosas, pelos conselhos e pela amizade inabalável que construímos durante todo esse tempo. Amo muito você!

Ao meu querido amigo, Felipe Grabarz, pela amizade que construímos desde a graduação, por fazer questão de sempre estar presente nos momentos mais importantes da minha vida. Muito obrigada!

Às minhas queridas amigas, Tayná, Daniela, Tatiane e Karina, pelas conversas, aventuras, risadas, histórias e por serem fundamentais na minha vida. Por não deixarem a distância abalar nossa linda amizade. Obrigada por se fazerem tão presentes. Amo vocês!

Ao Sr. Pedro Faria, pela confiança depositada para a execução deste projeto. Pelo suporte técnico oferecido durante esses anos e pela oportunidade de ter feito parte de sua equipe. Muito obrigada!

À Tatiana Alves dos Reis, pela amizade, pelo apoio técnico e científico, pelo companheirismo e ensinamentos fundamentais para a minha formação. Pela oportunidade em trabalharmos juntas, e por ser uma mãe para mim. Serei eternamente grata por tudo o que fez e faz. Amo você!

À Patrícia Zorzete, pela amizade, apoio técnico e científico, por toda boa vontade e auxílio durante todos esses anos. Te admiro muito! Muito obrigada por tudo!

Ao Rodrigo Cardoso de Oliveira, pela amizade construída durante esses últimos anos, pelos conselhos, pelo apoio técnico e pelo companheirismo. Muito obrigada, querido!

Aos queridos Ednei Assunção, Arianne Baquião, Danielle Atayde, Sabina Tralamazza, Mariana Soncin, Maitê Oliveira, Ludmila Jalaim, Luciana Gimenes, Priscila Bianchi e Vinícius de Morais pela prazerosa convivência durante esses anos. Por aturarem minhas cantorias e tagarelices. Adoro vocês!

Aos amigos do Laboratório de Micotoxinas do Instituto de Ciências Biomédicas, Lívia, Liliana, Gabriela, Raquel, Vinícius, Aline, Cynara, Márcia e Lorena pela convivência e companheirismo no laboratório.

Aos secretários do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina, Márcia e Lucas, por serem tão prestativos e pacientes comigo.

Às secretárias do Instituto de Ciências Biomédicas, Gisele, Elizabeth e Naíde pela ajuda prestada sempre que solicitada.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas, por ter sido imprescindível na realização deste trabalho.

À Faculdade de Medicina, por me conceder todo o suporte necessário para a execução do projeto.

À Universidade de São Paulo, pela qualidade de ensino.

À Biosphere Indústria e Comércio de Insumos Agrícolas Ltda., pelo auxílio financeiro concedido e também pela confiança depositada. Muito obrigada!

A todos aqueles que contribuíram, direta e indiretamente, para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

Se muito vale o já feito

Mais vale o que será

E o que foi feito

É preciso conhecer

Para melhor prosseguir.

(Fernando Brant)

RESUMO

Oliveira TD. *Biocontrole para fungos e micotoxinas em milho no campo* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Os grãos de milho são expostos, no campo e no armazenamento, à ação de fatores físicos, químicos e biológicos, que interagem entre si, favorecendo a contaminação fúngica, principalmente pelos gêneros *Aspergillus, Fusarium e Penicilllium*, considerados os mais importantes do ponto de vista toxigênico. O presente trabalho teve como principal objetivo investigar a eficácia do agente de biocontrole Afla-guard® no controle de fungos e de micotoxinas em grãos de milho, no campo, em diferentes estágios de maturidade da planta cultivada no município de Cássia dos Coqueiros, Estado de São Paulo. Visou, também, como objetivos adicionais, a determinação da atividade de água das amostras de milho, a pesquisa de fungos do ar, do solo e do milho, e a influência dos fatores climatológicos (temperatura e precipitação pluvial), no crescimento fúngico e na produção de micotoxinas. A micobiota do milho foi determinada pela técnica da semeadura direta utilizando meio de Ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol (DRBC) e a determinação de micotoxinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. A identificação dos fungos foi realizada utilizando metodologia clássica (morfológica) e molecular (sequenciamento do DNA ribossomal). Nas amostras de milho, constatou-se a predominância de *Fusarium verticillioides*, em todas as coletas. Entretanto, a presença de *Aspergillus flavus* foi detectada, nas áreas tratadas com produto, a partir da 4ª coleta. No ar atmosférico, os fungos mais frequentes foram: *Cladosporium* spp., *Trichoderma* spp. e *Fusarium solani*. *A. flavus* foi isolado, principalmente, na 3ª coleta, do tratamento. No solo, os gêneros *Penicillium, Trichoderma e Rhizopus* foram os mais isolados em todas as coletas. *A. flavus* foi isolado a partir da 3ª coleta, somente nas áreas tratadas. Das amostras analisadas, a presença de fumonisinas foi detectada em 33,3 % das amostras tratadas com o agente de biocontrole e em 66,6% das amostras do grupo controle (não tratadas). Em relação às aflatoxinas, a presença da toxina foi detectada em apenas 2 amostras (1 tratamento e 1 controle) na 4ª coleta. Quanto à análise do potencial aflatoxigênico determinado, encontramos em 4 dos 13 isolados de *A. flavus*, aflatoxinas B_1 e B_2. Os demais isolados não foram potencialmente produtores, podendo ser, portanto, oriundos do Afla-guard®. Já em relação à temperatura, 26 °C foi a média encontrada e 6,3 mm foi a média detectada em relação à precipitação pluvial. Embora não tenha apresentado resultados estatisticamente significativos, o emprego do agente de biocontrole foi relevante no que diz respeito a diminuição da contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. Entretanto, outros estudos são necessários para uma melhor avaliação do produto.

Palavras-chave: Contaminação de alimentos, agente de controle biológico, *Zea mays*, *Aspergillus flavus*, micotoxinas.

ABSTRACT

Oliveira TD. *Biocontrol for fungi and mycotoxins in maize in field* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Maize grains are exposed, in the field and in storage, the action of physical, chemical and biological agents that interact with each other, encouraging fungal contamination, mainly by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*, considered the most important from the point of view toxigenic. This study aimed to investigate the effectiveness of Afla-guard® biocontrol agent in control of fungi and mycotoxins in corn grain in the field, at different stages of maturity of the plant cultivated in the city of Cassia dos Coqueiros, state São Paulo. Aimed also as additional objectives, determining the water activity of the maize samples, the research air fungi, soil and maize, and the influence of climatic factors (temperature and rainfall) in fungal growth and mycotoxin production. The mycobiota maize was determined by the technique of direct seeding using means of Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) and the determination of mycotoxins by high-performance liquid chromatography. The identification of fungi was carried out using classical methods (morphological) and molecular (sequencing of ribosomal DNA). In samples of maize, there was a predominance of *Fusarium verticillioides* in all samplings. However, the presence of *Aspergillus flavus* was detected in the areas treated with product samplings from the 4th. In atmospheric air, the most common molds were *Cladosporium* spp, *Trichoderma* spp.. *Fusarium solani* and. *A. flavus* was isolated mainly in 3rd samplings, treatment. On the ground, *Penicillium*, *Trichoderma* and *Rhizopu*s were the most isolated in all samples. *A. flavus* was isolated from the 3rd collects only in the treated areas. Of the samples tested, the presence of fumonisin was detected in 33.3% of the samples treated with the biocontrol agent and 66.6% of the control group samples (untreated). Regarding the aflatoxins, the presence of the toxin was detected in just 2 samples (1 treatment and 1 control) in 4th collect. The analysis of the potential aflatoxigenic, found in 4 of 13 isolates of *A. flavus*, aflatoxins B_1 and B_2. The remaining isolates were not potentially producers and can therefore be derived from the Afla-guard®. Regarding the temperature 26 ° C was found to average 6.3 mm and the average was detected in relation to rainfall. Although not shown statistically significant results, the use of biocontrol agent is relevant as regards the reduction of contamination by *Fusarium verticillioides* and *fumonisins*. However, other studies are needed to better evaluate the product.

Keywords: Food contamination, biological control agent, fungi, *Zea mays*, *Aspergillus flavus*, mycotoxins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Anatomia do grão de milho e sua composição..... 27
Figura 2 Milho e seus derivados..... 29
Figura 3 Estruturas químicas das aflatoxinas B_1, B_2, G_1 e G_2..... 38
Figura 4 Estrutura química das fumonisinas..... 39
Figura 5 Região de Cássia dos Coqueiros, São Paulo, Brasil..... 48
Figura 6 Área experimental utilizada para plantio do milho..... 49
Figura 7 Área experimental utilizada para plantio do milho..... 49
Figura 8 Área experimental utilizada para plantio do milho..... 50
Figura 9 Afla-guard® ensacado e armazenado..... 49
Figura 10 Descrição do produto (Afla-guard®) no verso da embalagem..... 50
Figura 11 Descrição do produto (Afla-guard®) no verso da embalagem..... 50
Figura 12 Afla-guard® separado para ser lançado ao solo do tratamento (tamanho original)..... 51
Figura 13 Semente de cevada envolvida com conídios de *A. flavus* não-toxigênico (NRRL 21882), após ser lançado ao solo..... 51
Figura 14 Croqui da área experimental..... 52
Figura 15 Aparelho Monitor de Ar (T-air, Millipore)..... 54
Figura 16 Placas coletadas pelo T-air Millipore, após a incubação..... 55
Figura 17 Equipamento Medidor de Atividade de água (Aqualab CX-2)..... 56
Figura 18 Placas contendo Grãos de Milho, após incubação..... 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Linhagens de bactérias disponíveis comercialmente para o controle de fitopatógenos..... 41
Tabela 2 Produtos comerciais de controle biológico contendo linhagens de actinobactérias..... 42
Tabela 3 Espécies de leveduras utilizadas por Hua et al. (1999) para inibição da síntese de aflatoxinas..... 42
Tabela 4 Coletas realizadas e o nº de amostras obtidas para a determinação da micobiota e das micotoxinas..... 53
Tabela 5 Primers utilizados para o sequenciamento e suas respectivas sequências..... 57
Tabela 6 Coletas, Parcelas e Micobiota..... 68
Tabela 7 Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por metro cúbico de ar (m^3) das amostras coletadas do ar, no decorrer das coletas..... 70
Tabela 8 Número de UFC/g x 10^3 (Unidades Formadoras de Colônia por grama de substrato, multiplicado pelo fator de diluição 10^3) e Aa (Atividade de água) média das amostras de solo..... 73
Tabela 9 Frequência (%) de fungos isolados e Aa (Atividade de água) média das amostras de milho..... 77
Tabela 10 Ocorrência de *F. verticillioides* e *A. flavus* na micobiota do milho onde foi aplicado o agente de biocontrole..... 77
Tabela 11 Concentração (µg/kg) de fumonisinas nas amostras de milho da 3ª coleta..... 79
Tabela 12 Concentração (µg/kg) de fumonisinas nas amostras de milho da 4ª coleta..... 80
Tabela 13 Concentração (µg/kg) de fumonisinas nas amostras de milho da 5ª coleta..... 80
Tabela 14 Concentração (µg/kg) de aflatoxinas nas amostras de milho da 4ª coleta 81
Tabela 15 Dados climatológicos registrados na região de Cássia dos Coqueiros (SP)..... 82
Tabela 16 Valores de média e desvio padrão da variável UFC em relação às coletas..... 83
Tabela 17 Valores de média e desvio padrão da variável atividade de água em relação aos substratos..... 84
Tabela 18 Valores de média e desvio padrão da variável atividade de água em relação aos substratos..... 85
Tabela 19 Valores de média e desvio padrão da variável atividade de água em relação às coletas, no solo..... 85
Tabela 20 Valores de média e desvio padrão da variável “aflatoxinas” quanto às coletas (tratamento e controle) e Aa..... 86
Tabela 21 Valores de média e desvio padrão da variável “fumonisinas” quanto às coletas (tratamento e controle) e Aa..... 86

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Número de UFC/ m^3 de ar de *A. flavus*..... 71

Gráfico 2 Número de UFC/g x 10^3 de *A. flavus* na micobiota do solo (UFC/g x10^3)..... 74

Gráfico 3 Isolados fúngicos mais frequentes no milho em que foi aplicado o agente de biocontrole..... 76

Gráfico 4 Isolados fúngicos mais frequentes no milho do grupo controle..... 76

Gráfico 5 Frequência (%) de isolamento dos fungos *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* no milho..... 78

Gráfico 6 Dados climatológicos [índice pluviométrico médio (mm), temperaturas máxima média (°C) e mínima média (°C)] referentes ao período de outubro/2012 a março/2013 registrados na região de Cássia dos Coqueiros - SP..... 83

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%: por cento

’: minutos

°: grau

°C: graus Celsius

+: mais

-: menos

±: mais ou menos

<: menor

>: maior

®: marca registrada

α: alfa

µg/kg: micrograma por quilograma

µg/mL: micrograma por microlitro

µg: micrograma

µL/L: microlitro por litro

µL: microlitro

µm: micrometro

1C: 1ª coleta

2C: 2ª coleta

3C: 3ª coleta

4C: 4ª coleta

5C: 5ª coleta

3CCN: controle negativo da 3ª coleta

4CCN: controle negativo da 4ª coleta

5CCN: controle negativo da 5ª coleta

Aa: atividade de água

ACP: ácido ciclopiazônico

AFB_1: aflatoxina B_1

AFB_2: aflatoxina B_2

AFB_{2a}: aflatoxina B_{2a}

AFG_1: aflatoxina G_1

AFG_2: aflatoxina G_2

AFG_{2a}: aflatoxina G_{2a}

Água Milli-Q: água deionizada purificada em um sistema Milli-Q (Millipore Corporation)

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC: Association of Official Analytical Chemists

Buffer PB: tampão de ligação

Buffer PE: tampão de lavagem

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CA: Califórnia

CAST: Concil for Agricultural Science and Technology

CCD: cromatografia em camada delgada

CE: Comissão Europeia

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

cm: centímetro

cm^2: centímetro quadrado

cm: centímetro

CMD: calmodulina

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

CZ: Czapek

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNAr: ácido desoxirribonucleico ribossomal

dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados

DO: densidade óptica

DP: desvio padrão

Dr.: Doutor

DRBC: ágar dicloran rosa bengala cloranfenicol

EC: European Commission

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

EF: fator de elongação 1α

Elution buffer: tampão de eluição

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

et al.: e colaboradores

EUA: Estados Unidos da América

FAO: Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FB1: Fumonisina B_1

FB2: Fumonisina B_2

FB3: Fumonisina B_3

FB4: Fumonisina B_4

FNE: Fungo Não Esporulado

g: grama

GFSC: *Giberella fugikuroi* Species Complex

h: hora

HIV-1: vírus da imunodeficiência humana subtipo 1

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

ITS: internal transcribed spacer

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

kCal: quilocaloria

kg: quilograma

LD: limite de detecção

LQ: limite de quantificação

Ltda: limitada

M: molar

m: metro

mA: miliampere

MA: Massachusetts

Max: máximo

MD: Maryland

MEA: Ágar extrato de malte

MG: Minas Gerais

MI: Michigan

mg/kg: miligrama por quilograma

mg: miligrama

Min: mínimo

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

MO: Missouri

mV: milivolt

m^2: metro quadrado

m^3: metro cúbico

nd: não detectado

ng/mL: nanograma por microlitro

ng: nanograma

NJ: Nova Jersey

nm: nanômetro

n°: número

NRRL: coleção de culturas do Agricultural Research Service (ARS)

OPA: ortoftaldeído

P.A.: para análise

PBS: tampão fosfato

PDA: ágar batata dextrose

pH: potencial hidrogeniônico

pmol: picomol

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

Rf: índice de retenção

rpm: rotação por minuto

SP: São Paulo

spp.: espécie

t: tonelada

TAE: tris acetato EDTA

TFA: ácido trifluoracético

TM: Trademark

TN: Tennessee

UFC/g: unidades formadoras de colônia por grama

UFC/m^3: unidades formadoras de colônia por metro cúbico

USDA:United States Department of Agriculture

UV: ultravioleta

v/v: volume para volume

WA: Washington

WI: Wisconsin

YES: Extrato de Levedura – Sacarose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA..... 25
1.1. Milho..... 26
1.2. Micobiota..... 29
1.2.1. Generalidades sobre *Aspergillus flavus*..... 29
1.2.2. Generalidades sobre *Fusarium verticillioides*..... 31
1.2.3. Interações fúngicas..... 33
1.3. Micotoxinas..... 34
1.3.1. Aflatoxinas..... 35
1.3.2. Fumonisinas..... 37
1.4. Controle Biológico..... 40
1.4.1. Afla-guard®..... 43
2. PROPOSIÇÃO E OBJETIVOS..... 44
3. MATERIAIS E MÉTODOS..... 46
3.1. Local do experimento e caracterização das parcelas..... 47
3.2. Produto utilizado..... 49
3.3. Amostragens de milho, solo e ar e delineamento experimental..... 51
3.4. Coletas..... 53
3.5. Isolamento de fungos do ar..... 54
3.6. Determinação da atividade de água..... 54
3.7. Determinação da micobiota das amostras de solo..... 55
3.8. Determinação da micobiota das amostras de milho..... 56
3.9. Sequenciamento de DNA dos isolados fúngicos..... 57
3.10. Determinação de micotoxinas nas amostras de milho..... 58
3.10.1. Otimização dos métodos para detecção de micotoxinas..... 58
3.10.1.1. LD e LQ..... 59
3.10.1.2. Testes de recuperação de micotoxinas e repetibilidade..... 59
3.10.1.3. Curvas de calibração para aflatoxinas..... 60
3.10.1.4. Curvas de calibração para fumonisinas..... 60
3.10.2. Determinação de fumonisinas nas amostras de milho..... 60
3.10.3. Determinação de aflatoxinas em amostras de milho..... 61
3.10.4. Avaliação do potencial toxigênico dos isolados de *A.flavus*..... 62
3.11. Análise dos fatores climatológicos de Cássia dos Coqueiros..... 63
3.12. Análise estatística..... 63
4. FLUXOGRAMA..... 65
5. RESULTADOS..... 67

5.1. Micobiota do ar..... 68
5.1.1. 1ª coleta (somatória das 5 parcelas) 68
5.1.2. 2ª coleta (somatória das 5 parcelas) 68
5.1.3. 3ª coleta (somatória das 5 parcelas) 69
5.1.4. 4ª coleta (somatória das 5 parcelas) 69
5.1.5. 5ª coleta (somatória das 5 parcelas) 69
5.2. Micobiota do solo e atividade de água..... 71
5.2.1. 1ª coleta (somatória das 5 parcelas) 71
5.2.2. 2ª coleta (somatória das 5 parcelas) 72
5.2.3. 3ª coleta (somatória das 5 parcelas) 72
5.2.4. 4ª coleta (somatória das 5 parcelas) 72
5.2.5. 5ª coleta (somatória das 5 parcelas) 72
5.3. Micobiota do milho e atividade de água..... 74
5.3.1. 3ª coleta..... 74
5.3.2. 4ª coleta..... 75
5.3.3. 5ª coleta..... 75

5.4. Identificação das espécies dos gêneros *Fusarium* e *Aspergillus* por metodologia clássica e molecular..... 78

5.5. Avaliação da metodologia analítica para determinação das fumonisinas B_1 e B_2..... 78

5.6. Determinação de fumonisinas nas amostras de milho..... 79

5.6.1. 3ª coleta..... 79
5.6.2. 4ª coleta..... 80
5.6.3. 5ª coleta..... 80

5.7. Avaliação da metodologia analítica para determinação das aflatoxinas B_1 e B_2..... 80

5.8. Determinação de aflatoxinas nas amostras de milho..... 81

5.8.1. 4ª coleta..... 81
5.8.2. 5ª coleta..... 81
5.9. Avaliação do potencial toxigênico dos isolados de *A. flavus*..... 82
5.10. Estudo da termotolerância dos isolados de *A. flavus*..... 81
5.11. Análise dos fatores climatológicos da região de Cássia dos Coqueiros... 82

5.12. Análise estatística..... 83
5.12.1. Variável UFC..... 83
5.12.2. Variável atividade de água..... 84
5.12.3. Variável micotoxinas (aflatoxinas e fumonisinas)..... 85
6. DISCUSSÃO..... 87
7. CONCLUSÕES..... 93
8. ANEXOS..... 95
ANEXO A. 95
ANEXO A.1. Micobiota do ar..... 95
ANEXO A.2. Micobiota do solo..... 97
9. REFERÊNCIAS..... 100

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

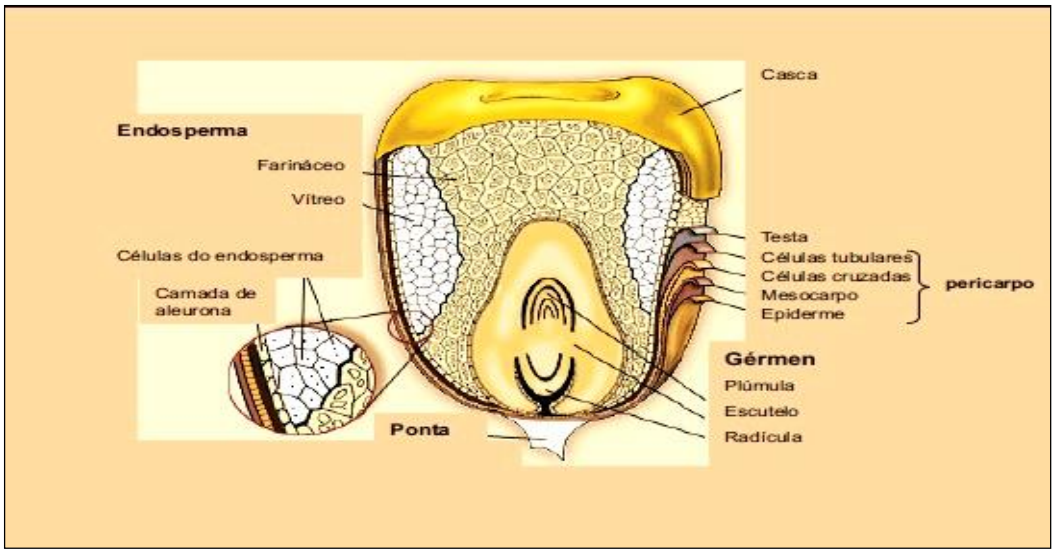
1.1. Milho

O milho é uma monocotiledônea pertencente à família *Poaceae*, gênero *Zea*, espécie *Zea mays* L (Fancelli, 1983; Watson e Ramstad, 1987).

Essa planta é originária da mesoamérica, um dos mais importantes centros de domesticação de vegetais. A região compreende do Tampico, no Golfo do México, até a parte meridional de Sinaloa, no Pacífico, limitada ao sul com Honduras e Nicarágua (Machado e Magnavaca, 1991).

O peso individual do grão varia, em média, de 250 a 300 mg e sua composição média em base seca é 72% amido, 9,5% de proteínas, 9% de fibra e 4% óleo (Paes, 2006). Esta constituição faz com que este cereal seja utilizado no preparo de produtos alimentícios diversificados, sendo relevante fator sócio econômico para muitas regiões do mundo (Nogueira-Júnior et al., 1987).

Apresenta-se como um produto de relevante importância econômica, sendo utilizado na alimentação humana e animal e até na indústria de alta tecnologia, na produção de biofilmes e embalagens biodegradáveis. A produção mundial de milho destinada à alimentação animal é de cerca de 70% a 85%, em países desenvolvidos. Em termos gerais, apenas 15% de toda a produção mundial destina-se ao consumo humano, de forma direta ou indireta (Paes, 2006).



FONTE: Paes, 2006.

Figura 1 – Anatomia do grão de milho e sua composição.

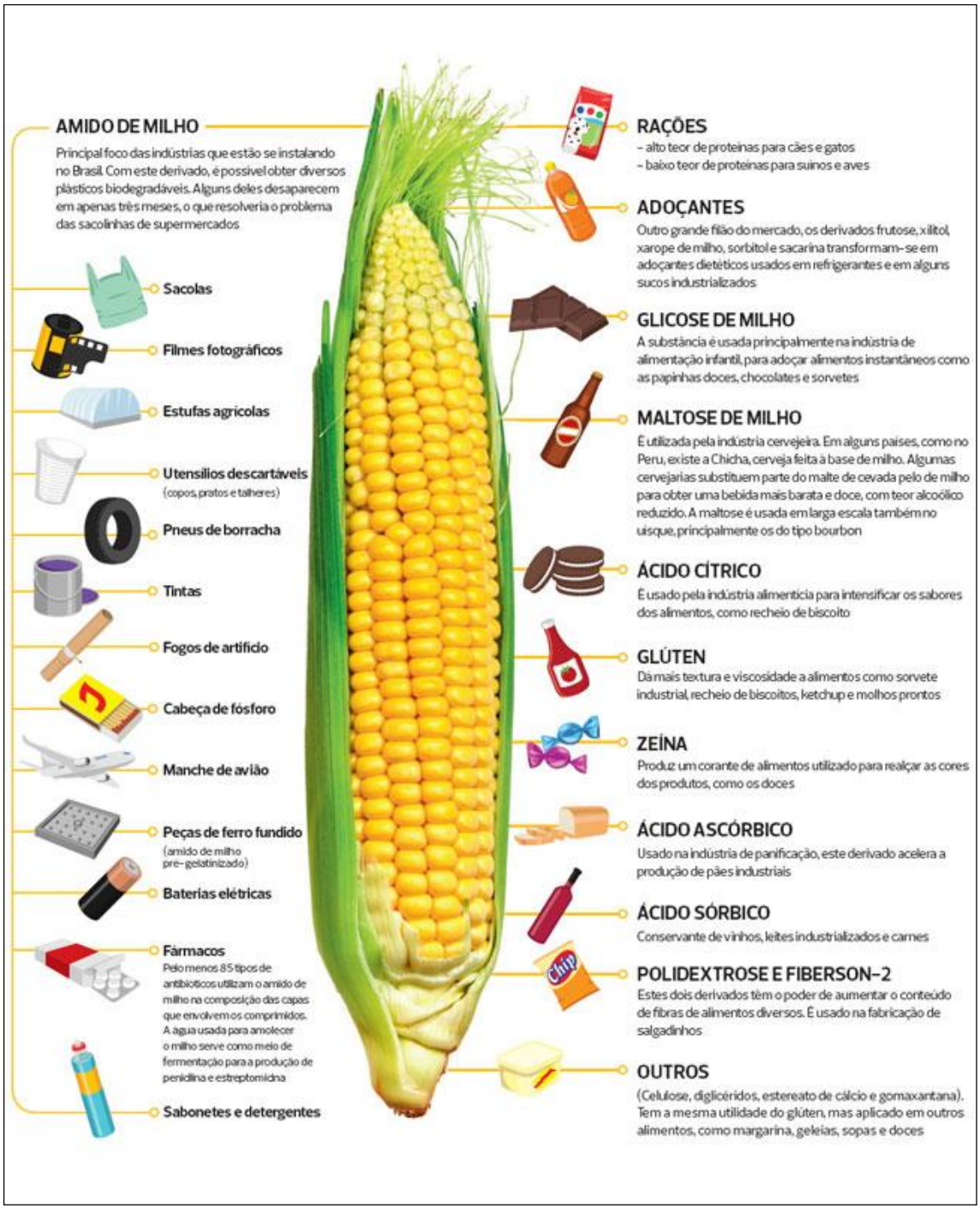
A cultura do milho pode ser considerada uma das mais importantes no cenário agrícola brasileiro. É fundamental para as cadeias produtivas de aves, suínos e bovinos leiteiros, sendo o principal insumo da ração animal (Conab, 2011).

Atualmente, a China é o maior produtor de milho no mundo (Zhang et al., 2013). O cultivo de milho mundial abrange cerca de 150 milhões de hectares, com produção oscilando de 550 a 580 milhões de toneladas, anualmente. O Brasil é considerado o terceiro maior produtor e consumidor deste grão, superado pelos Estados Unidos e China, que ainda disputa com a Ucrânia a posição de 3º maior país exportador do cereal (Conab, 2012). Na safra 2013/2014, o Brasil obteve produção de 79 milhões de toneladas em uma área cultivada de 16 milhões de hectares (Conab, 2014).

Muitos problemas podem afetar a cultura do milho, os quais, destacam-se: fertilidade do solo, época de semeadura, potencial produtivo do híbrido e ataque de agentes nocivos como plantas daninhas, pragas e doenças (Pereira, 1997).

As principais doenças associadas ao milho, no Brasil, são causadas por vírus, bactérias e fungos, sendo os últimos representados, principalmente pelos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Os efeitos do crescimento fúngico incluem: diminuição do poder de germinação, emboloramento visível, descoloração, odor desagradável, perda de matéria seca, aquecimento, mudanças químicas e nutricionais, perda de qualidade e produção de compostos tóxicos, micotoxinas (Pomeranz, 1982).

A produtividade do milho depende de vários fatores integrados, sendo os mais importantes a interceptação de radiação pelo dossel, eficiência metabólica, eficiência de translocação de fotossintatos para os grãos e a capacidade de dreno. As respostas diferenciadas dos genótipos à variabilidade ambiental significam que os efeitos genotípicos e ambientais não são independentes. Daí a importância de conhecer a época de plantio analisando todo o ciclo da cultura, procurando prever as condições ambientais em todas as suas fases fenológicas. A produtividade, geralmente, é mais alta quando as condições do tempo permitem o plantio em outubro. Depois disso, há redução no ciclo da cultura e queda no rendimento por área (Embrapa, 2009).



FONTE: Globo Rural, 2012

Figura 2 – Milho e seus derivados

1.2. Micobiota

A contaminação dos grãos de milho pode ocorrer desde o cultivo até a colheita, assim como no transporte, armazenamento e nas diferentes fases de produção, ocorrendo com maior intensidade sob condições de temperatura e umidade favoráveis (Frisvad e Samson, 1991). Tais grãos podem ser colonizados por uma ampla variedade de bolores pré e pós-colheita, e a espécie predominante dependerá de fatores bióticos e abióticos. Assim sendo, os grãos de milho se tornam particularmente susceptíveis à colonização fúngica após ocorrer a emergência do tecido (Sutton, 1982; Miller, 1994).

Aspergillus flavus, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Penicillium* spp. e *Diplodia maydis* são os fungos de mais comum colonização nos grãos de milho (González et al., 2003; Kpodo et al., 2000). Estes fungos podem produzir diferentes tipos de micotoxinas.

Além do grão, o solo também é um ambiente propício para a colonização fúngica, sendo considerado o reservatório primário de muitos fungos, inclusive os do gênero *Aspergillus* (Smith e Ross, 1991). Das espécies de fungos que habitam o solo, a maioria cresce e se desenvolve próximo à superficie, onde prevalecem as condições de aerobiose. As espécies fúngicas mais comuns pertencem aos gêneros *Penicillium, Mucor, Rhizopus, Fusarium, Cladosporium, Aspergillus* e *Trichoderma* (Pelczar Júnior, 1997).

Uma larga variedade de fungos também podem ser encontrados na atmosfera. No campo, quando depositados em um hospedeiro susceptível, sob condições ambientais favoráveis, induzem contaminação que pode levar à perda completa da colheita. Cerca de 70% das doenças das culturas no campo, são causadas por fungos (Hurst, 1996). Os principais pertencem aos gêneros *Cladosporium, Penicillium, Aspergillus, Alternaria, Aureobasidium, Phoma, Trichoderma, Fusarium, Curvularia, Helminthosporium, Rhodotorula, Epicoccum* e *Cephalosporium* (Morrow et. al, 1964).

1.2.1. Generalidades sobre *Aspergillus flavus*

O gênero *Aspergillus* Link foi descrito inicialmente pelo botânico italiano Pier Antonio Micheli, em 1729, que descreveu 1900 plantas e 900 fungos. Neste estudo, a visualização microscópica das estruturas produtoras de conídios das espécies de *Aspergillus*, foi associada a

um objeto usado pela igreja católica para borrifar água benta durante uma parte da liturgia, chamado aspérgilo (Ainsworth, 1976), através dessa observação atribuiu-se o nome *Aspergillus* a esse gênero fúngico. Após cerca de 100 anos, o gênero foi validado por Link (1809). Hoje, o gênero *Aspergillus* pertence ao filo *Ascomycota*, ordem *Eurotiales*, família *Trichocomaceae*, tendo a descrição mais completa realizada por Raper e Fennell (1965), que reconheceram 132 espécies. Neste tratado, o gênero *Aspergillus* foi descrito em relação aos aspectos morfológicos e às formas sexuadas (teleomorfo) e assexuadas (anamorfo).

Atualmente, o gênero *Aspergillus* é constituído por aproximadamente 260 (Geiser et al., 2007; Samson e Varga, 2009) a 837 espécies (Hawksworth, 2011), divididas em 7 subgêneros (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati*, *Flavipedes*, *Nidulantes*, *Clavati* e *Ornati*). Cada subgênero é divido em seções e cada seção compreende um conjunto de espécies correlacionadas.

As espécies de *Aspergillus* encontram-se entre os fungos mais abundantes em todo o mundo, sendo relativamente pouco exigentes em relação aos fatores abióticos de crescimento. Por exemplo, eles podem crescer em uma vasta gama de temperaturas (6 - 55 °C) e em ambientes com umidade baixa, sendo que algumas espécies de *Aspergillus* requerem atividade de água mínima para crescimento de 0,71 (Lacey, 1989).

Macroscopicamente, as colônias pertencentes ao gênero *Aspergillus* caracterizam-se pelo desenvolvimento de colônias coloridas e brilhantes e por produzir conídios em cabeças típicas, do tipo “mop-like” ou escovão (Pitt e Hocking, 2009). As colônias de *A. flavus* são caracteristicamente verdes a amarelo-oliva, embora eventualmente possam apresentar coloração amarelo puro.

Microscopicamente, os conidióforos de *A. flavus*, *A. parasiticus* e *Aspergillus nomius* surgem a partir de hifas vegetativas septadas. As fiálides podem surgir diretamente de uma vesícula globosa (condição unisseriada) ou a partir da métula que envolve a superfície da vesícula (condição bisseriada). A vesícula, a métula quando presentes, as fiálides, e as cadeias de conídios compreendem a cabeça conidial, que no *A. parasiticus* é predominantemente unisseriada, enquanto que no *A. flavus*, a seriação é mais variável (Kokalis-Burelle et al., 1997).

Os conídios de *A. flavus* e *A. nomius* têm paredes delgadas, lisas ou levemente rugosas, são esféricos a elipsoidais com vesículas maiores que 50 µm, com métulas presentes. Já os conídios de *A. parasiticus* são rugosos, com paredes espessas, esféricos, e suas vesículas não ultrapassam 30 µm, e métulas são incomuns (Pitt e Hocking, 2009).

*A. flavus s*e desenvolve bem em substratos oleaginosos, aumentando o nível de produção de aflatoxinas. Também são encontrados, com menor frequência, em substratos ricos em amido,

como o milho, podendo produzir aflatoxinas e ácido ciclopiazônico, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Podem estar distribuídos pelo mundo todo, no solo, ar, material orgânico e partes de plantas (Diener, 1977; Cotty et al., 1994).

Umidade relativa do ar entre 80% e 90% e temperatura acima de 25 ºC favorecem o desenvolvimento de *A. flavus*, caracterizando-o como fungo de armazenamento. Todavia, esta classificação não é apropriada para regiões tropicais, pois esta espécie também pode ser isolada de grãos provenientes do campo durante o desenvolvimento da planta (Christensen e Sauer, 1982; Cast, 2003). Em geral, o desenvolvimento ótimo dos fungos ocorre em temperaturas entre 25 ºC e 30 ºC (Carlile e Watkinson, 1994), sendo que o crescimento do *A. flavus* ocorre a uma temperatura ótima de 35 ºC (Lacey et al., 1991; Leitão, 1988).

Isolados de *A. flavus*, podem ou não produzir aflatoxinas. Quando as produzem, sintetizam AFB_1 e AFB_2 (Pitt, 1997). Conídios de *A. flavus* podem também serem transportados por partículas do ar, insetos, plantas e solos (Abbas, 2011). O solo é um grande reservatório de micro-organismos e abriga muitos destes fungos, favorecendo a contaminação por aflatoxinas (Angle et al., 1982; Horn et al., 1994; Lillehoj et al., 1980).

1.2.2. Generalidades sobre *Fusarium verticillioides*

F. verticillioides (Sacc.) Nirenberg (sinônimo de *F. moniliforme* Sheldon) é uma espécie fúngica ubíqua, predominante em regiões tropicais e temperadas. Possui duas fases, uma anamórfica (assexuada), sendo denominado como *F. verticillioides*, e uma teleomórfica (sexuada), conhecida como *Gibberella moniliformis* (sinônimo de *Gibberella fujikuroi*) (Covarelli et al., 2012; Leslie, 1996; Leslie e Klein, 1996; Woloshuk e Shin, 2001).

Este fungo pode infectar os grãos fazendo uso de três vias: invasão sistêmica, mediante contaminação das sementes, uma vez que é considerado um fungo endofítico; por fissuras na planta já desenvolvida; ou através do “cabelo do milho” (Munkvold et al., 1997). Dentre essas rotas de contaminação, a infecção nos grãos ocorre de forma mais eficiente quando as cepas de *F. verticillioides* são inoculadas nos “cabelos do milho”, proporcionando rompimento da casca e maior severidade no apodrecimento da espiga (Warfield e Davis, 1996).

A colonização das plantas ou dos grãos por este fungo pode causar o apodrecimento dos substratos. Perdas causadas por *Fusarium* spp. variam de 5 a 10%, podendo chegar a 100% em

determinadas áreas (Mills, 1989). A etiologia do complexo *Fusarium* - apodrecimento de caule e raiz - depende do genótipo do hospedeiro, da espécie do patógeno, das condições ambientais, além de variáveis como tipo de solo, fertilidade, drenagem do solo, práticas culturais, umidade e insetos (Frederiksen e Odvody, 2000). Soma-se a isso a sua capacidade de produzir fumonisinas. Outro fator que torna *F. verticillioides* importante, do ponto de vista de saúde humana e animal, é a sua capacidade de colonizar assintomaticamente a planta ou os grãos. Consequentemente, essa colonização faz com que os fungos e suas toxinas sejam processados e consumidos. Entretanto, Munkvold e Desjardins (1997) relataram que a relação entre milho e *F. verticillioides* pode trazer benefícios para a planta, podendo estimular seu crescimento e desenvolvimento, protegendo a planta contra outros agentes patogênicos ou insetos, reduzindo a infecção por *Fusarium graminearum* e *Aspergillus flavus* e, diminuindo desta forma, a produção de aflatoxinas.

Segundo Leslie, Zeller e Summerell (2001) existem várias espécies de *Fusarium* classificadas erroneamente como *F. verticillioides*, o que torna o estudo deste fungo mais complexo. Questões concernentes à natureza e distribuição da variação genética dentro de uma população de patógenos frequentemente coincidem com questões relacionadas a diferenças em nível de espécie. Embora a morfologia fornecesse a única chave para a taxonomia, a biologia molecular integrada às características biológicas transformou-se numa ferramenta essencial para a identificação exata e rápida de espécies de *Fusarium* (Leslie e Klein, 1996; Leslie et al., 2001).

Características morfológicas são utilizadas para a identificação inicial de *Fusarium* (Leslie e Summerell, 2006). Utilizando critérios morfológicos, Nelson, Touson e Marasas (1983) classificaram as espécies de *Fusarium* em 16 seções. Na seção *Liseola*, onde se encontrava *F. verticillioides*, foram incluídos os fungos cuja característica principal era ausência de clamidósporos. Entretanto, *F. nygamai*, produtor de clamidósporo, também foi agrupado na referida seção. A solução foi a sua substituição para o sistema *Gibberella fujikuroi*, formado por espécies geneticamente distintas com anamorfo *Fusarium* (Leslie e Summerell, 2006).

Um dos conceitos biológicos que define o termo “espécie” é a capacidade que os indivíduos (dentro de um grupo) têm de produzirem um novo indivíduo igualmente fértil (Futuyma, 1997). No complexo *G. fujikuroi*, as espécies biológicas são consideradas heterotálicas, ou seja, para a ocorrência de reprodução sexuada entre cepas da mesma espécie há necessidade que cada um dos isolados apresente tipos diferentes de reação sexual ou *mating*

types. O sistema *mating types* é conduzido pelo loco *Mat*, composto por um dos dois alelos, denominados *Mat-1* e *Mat-2* (Steenkamp et al., 2000). Os isolados podem atuar como fêmeas, machos ou hermafroditas (Leslie e Klein, 1996). *F. verticillioides* corresponde à população *mating* "A", mais frequentemente isolada do milho e capaz de produzir elevados níveis de fumonisinas (Leslie e Summerell, 2006).

Segundo Woods e Duniway (1986), a Aa ótima e a mínima para crescimento de *F. verticillioides* é de 0,98 e 0,87, respectivamente. Já em relação à temperatura, a máxima se encontra entre 32-37 ºC e a mínima entre 2,5-5 °C, com ótima próxima a 25 ºC (Nirenberg, 1976). Para a produção de fumonisinas o valor de Aa mínima é 0,90 (Cahagnier et al., 1995).

1.2.3. Interações fúngicas

O estudo da colonização ecológica entre fungos que se desenvolvem em um mesmo substrato, pode fornecer maior compreensão sobre os mecanismos que controlam a produção de micotoxinas (Moreira, 1989).

As interações ecológicas podem ser do tipo antagônica ou sinergista. O antagonismo entre dois micro-organismos que competem pelo mesmo substrato, pode se dar de forma ativa ou passiva. O antagonismo ativo ocorre quando há inibição por contato (a hifa do fungo antagonizado sofre plasmólise ao entrar em contato com a hifa do fungo antagonista); alteração do substrato (o antagonista produz e excreta para o ambiente substâncias que inibem o crescimento do antagonizado, tais como antibióticos e ácidos); ou quando há micoparasitismo (as hifas dos dois fungos entrelaçam-se, sendo que o parasita pode matar seu hospedeiro ou viver em simbiose com ele). No antagonismo passivo não há inibição de um micro-organismo pelo outro, mas sim competição por espaço ou por nutrientes essenciais ao desenvolvimento, com vantagem para o micro-organismo que estiver em maior número, que possuir maior taxa de crescimento, ou melhor aptidão para explorar o substrato. No caso das interações sinergistas, elas favorecem um ou ambos os micro-organismos na ocupação do ambiente (Deacon, 1980).

Em relação aos fungos toxigênicos, as interações que ocorrem entre eles e outros micro-organismos, podem interferir no seu metabolismo, inibindo ou estimulando a produção de toxina. Alguns micro-organismos são também capazes de degradar micotoxinas, afim de usá-las como nutrientes ou para não ser inibidos por elas (Moreira, 1989).

De acordo com Deacon (1984) e Lillehoj et al. (1982), *A. flavus* e *F. verticillioides* também interagem entre si através de antagonismo passivo, sendo o último considerado forte

competidor em relação ao primeiro. Marín et al. (1998), estudando a influência da Aa e da temperatura nas interações entre os fungos filamentosos, observou que isolados de *F. verticillioides* se demonstravam mais competitivos e abeis na inibição de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, quando mantidos em um substrato com altos níveis de atividade de água, a uma temperatura de 15 ºC.

1.3. Micotoxinas

O termo micotoxina é originado da palavra grega "mykes", que significa fungo; e do latim "toxicum", que significa veneno ou toxina (Bullerman, 1979; Goldblatt, 1972).

Os metabólitos primários dos fungos, e também de outros organismos, são aqueles indispensáveis ao seu crescimento, como carbono, açúcares e lipídios (Bu'lock, 1980). Já os metabólitos secundários, que caracterizam as quinomas, os pigmentos, os antibióticos e as micotoxinas, são produzidos por diversas espécies de fungos ao final da fase de crescimento exponencial, dependendo do acúmulo dos precursores originados do metabolismo primário, como acetatos, piruvatos e aminoácidos (Steyn, 1977).

A produção de micotoxinas pelos fungos depende de uma série de fatores, incluindo a susceptibilidade do substrato à colonização do fungo produtor; fatores físicos como temperatura do ambiente, umidade do substrato, umidade relativa do ar durante o armazenamento, aeração, danos mecânicos, tempo de armazenamento, e fatores biológicos como capacidade genética do fungo em produzir micotoxinas, quantidade de esporos viáveis, interação de diferentes fungos existentes no mesmo substrato, interação de micotoxinas e presença de insetos (Ciegler, 1978).

Estas micotoxinas mantem sua atividade biológica por um longo período, podendo causar as micotoxicoses (Jay, 1994); quando associadas aos alimentos e ração animal, são ingeridas, causando graves efeitos sobre a saúde (Santurio, 2000), acarretando efeitos tóxicos agudos ou crônicos, dependendo do sistema teste, dosagem e frequência da exposição (Jay, 1994). Segundo Miller (1994), a exposição crônica às micotoxinas através da dieta, ou seja, a ingestão de pequenas doses por um longo período acarreta efeitos mais significativos que a exposição aguda, sendo diretos e substanciais na saúde humana.

Existem centenas de micotoxinas detectadas produzidas por pelo menos 350 espécies de fungos (Sabino, 2004), porém as mais estudadas e comumente encontradas em alimentos são: aflatoxinas e ácido ciclopiazônico, produzidas principalmente, por *Aspergillus* spp.; fusariotoxinas, representadas pela zearalenona, fumonisinas, moniliforminas e tricotecenos,

produzidas por *Fusarium* spp.; e ocratoxinas, produzidas por *Aspergillus alutaceus* (*A. ochraceus*) e várias espécies do gênero *Penicillium* (Clevström, 1986).

De acordo com Taniwaki e Silva (2001), as micotoxinas muitas vezes ocorrem em baixas concentrações, o que dificulta sua detecção. Além disso, uma mesma toxina pode ser produzida por uma variedade de fungos, porém, nem todos os fungos são produtores de micotoxinas. Dentro de uma mesma espécie, existem cepas produtoras e outras não produtoras de micotoxinas (Rossetto et al., 2005). A ausência de sinais visíveis do crescimento fúngico não pode ser totalmente interpretada como ausência de toxinas, já que estas são capazes de permanecer em um alimento, mesmo depois que o fungo produtor tenha sido eliminado (Taniwaki e Silva, 2001).

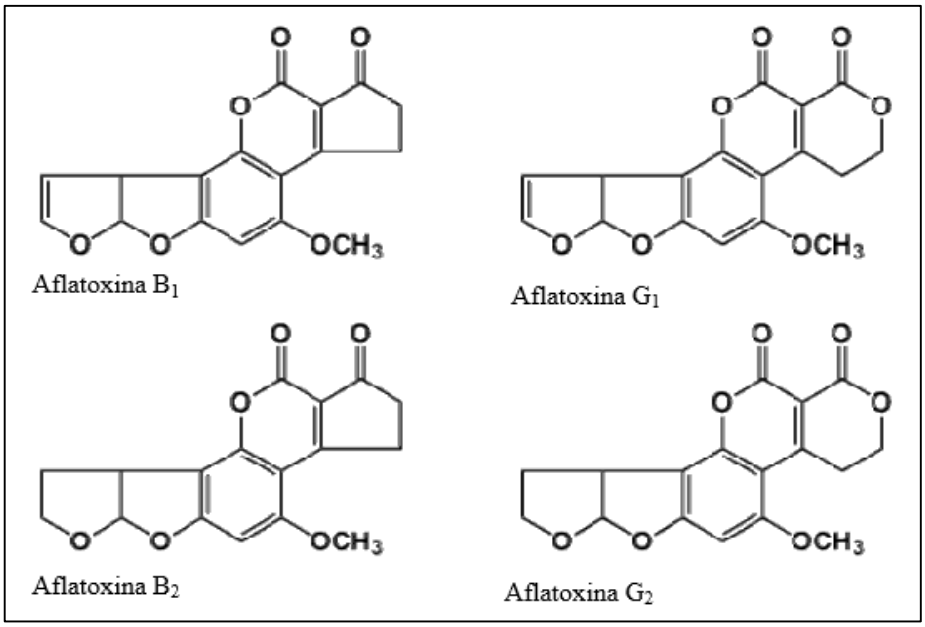
1.3.1. Aflatoxinas

As aflatoxinas são um grupo estreitamente relacionado e amplamente estudado produzidas por uma variedade de diferentes espécies de *Aspergillus*. As aflatoxinas foram encontradas em 3 grupos filogeneticamente diferentes: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. parvisclerotigenus*, *A. nomius*, *A. bombycis* e *A. pseudotamarii* na seção *Flavi*, *A. ochraceoroseus* e *A. rambellii* na seção *Ochraceorosei* e *Emericellaastellata* e *E. venezuelensis* na seção Nidulantes (Frisvad et al., 2005). Em virtude de sua capacidade de ligação ao DNA das células, esses metabólitos são carcinógenos naturais que afetam animais e humanos (Bedard e Massey, 2006). Dentre estes, as aflatoxinas mais comumente estudadas são: aflatoxina B_1 (AFB_1), aflatoxina B_2 (AFB_2), aflatoxina G_1 (AFG_1) e aflatoxina G_2 (AFG_2), que receberam estas denominações, pois emitem fluorescências azuis e verdes ("blue" e "green", respectivamente) sob luz ultravioleta (Allcroft et al., 1966; De Iongh et al., 1964). A estrutura química das aflatoxinas é formada por um núcleo cumarínico fundido a um anel bifurano e um anel pentanona (AFB_1 e AFB_2) ou 6-lactona (AFG_1 e AFG_2) (Applebaum et al., 1982). A biotransformação das aflatoxinas é promovida por enzimas e podem ser divididas em duas fases. Na primeira, ocorrem reações de oxidação, redução e hidrólise, tornando as moléculas mais hidrofílicas. Na segunda fase, os compostos produzidos são conjugados a substâncias endógenas (sulfato, glutationa, aminoácidos e grupos metil e acil), facilitando a excreção. Este processo consiste em alterações moleculares reversíveis e irreversíveis. A detoxificação ocorre mediante reações irreversíveis, produzindo metabólitos hidroxilados, hidrossolúveis e menos tóxicos que os precursores (aflatoxinas M_1, Q_1, P_1, B_{2a}). Já a detoxificação reversível ocorre com formação de aflatoxicol, que posteriormente retorna a forma de AFB_1 por intermédio de

reações de oxidação. A principal reação de ativação da AFB_1 caracteriza-se pela epoxidação da molécula, formando o composto 8,9-epóxido de aflatoxina, o qual possui propriedades de ligação covalente com ácidos nucleicos, refletindo em atividades mutagênicas, teratogênicas, carcinogênicas e diminuição de produção de proteínas. Essas reações ocorrem no sistema enzimático citocromo P-450, composto por enzimas responsáveis pelas reações de oxidação, especialmente epoxidação de ligações covalentes, importantes na ativação de xenobióticos (Smith e Ross, 1991).

As aflatoxinas mais comumente produzidas pelo *A. flavus* são as AFB_1 e AFB_2, enquanto *A. parasiticus* e *A. nomius* produzem além das duas aflatoxinas já mencionadas, as AFG_1 e AFG_2 (Figura 3). Na maioria dos isolados produtores, a AFB_1 é produzida em grandes quantidades (Council for Agricultural Science and Technology, 2003; Smith; Ross, 1991). AFB_1 é a mais tóxica das quatro principais substâncias, apresentando propriedades hepatotóxicas, teratogênicas e mutagênicas, podendo causar hemorragias, edemas, imunossupressão e carcinoma hepático (Smith; Ross, 1991). A manifestação de seus efeitos carcinogênicos ocorre após a conversão hepática em AFB_1-epóxido, o qual reage com macromoléculas e ácidos nucleicos (Busby; Wogan, 1984). A AFB_1 é classificada no grupo 1 dos carcinógenos humanos pela “International Agency for Research on Cancer” (IARC, 1993).

No Brasil, o Ministério da Saúde (resolução RDC no. 7, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA - de fevereiro de 2011) estabeleceu o limite máximo de aflatoxinas (B_1+B_2+G_1+G_2) permitido em milho para consumo humano de 20 µg/kg (ppb) (Brasil, 2011).



FONTE: Hussein; Brasel, 2001

Figura 3 - Estruturas químicas das aflatoxinas B_1, B_2, G_1 e G_2

1.3.2. Fumonisinas

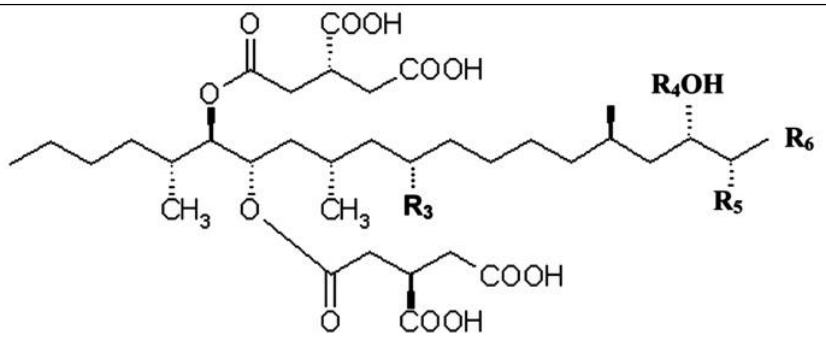
F. verticillioides é o principal produtor de fumonisinas, que, são metabólitos secundários, descobertos na África do Sul em 1988 (Gelderblom et al., 1988; Scott, 1993, 2012).

Além dessas espécies, existem várias outras espécies do gênero produtoras de micotoxinas, tais como: *F. anthophilum* (A. Braun) Wollenw., *F. dlamini* Marasas, Nelson, et Toussoun, *F. napiforme* Marasas, Nelson, et Rabie, *F. nygamai* Burgess et Trimboli, *F. thapsinum* Klittich, Leslie, Nelson, et Marasas, *F. sacchari* (Butler) W. Gams, *F. fujikuroi* Nirenberg, *F. subglutians* (Wollenw et Reinking) Nelson, Toussoun, et Marasas, *F. subglutians* sensu lato, *F. pseudonygamai* (*Nirenberg, O'Donnell*), *F. andiyazi* Marasas et al. e *F. polyphialidicum* Marasas, P.E. Nelson, Toussoun & P.S. van Wyk (Marín et al., 2004; Rheeder et al., 2002).

As fumonisinas são frequentemente encontradas em milho e alimentos à base de milho (Shephard et al., 1996; Weidenborner, 2001). São compostos polares e solúveis em água e acetonitrila-água, mas não são solúveis em solventes orgânicos (Waskiewicz et al., 2012).

Das quatro fumonisinas da série B (FB_1, FB_2, FB_3 e FB_4), dentre outras séries análogas (Rheeder, 2002) (Figura 4), a fumonisina B_1 (FB_1) é a principal delas, sendo considerada a mais

tóxica e a mais frequente na natureza (Nelson et al., 1992; Sydenham et al., 1991; Scott, 2012). A FB_1 está presente não apenas no milho e em seus subprodutos, mas também em cerveja, arroz, sorgo, feijão-de-corda, feijões, soja e aspargos (Scott, 2012). Ela pode ocasionar leucoencefalomalácia em equinos (LEME), edema pulmonar em suínos, câncer hepático em ratos, redução do desenvolvimento, imunossupressão, problemas cardíacos, degeneração e necrose hepática em aves, além de estar associada ao câncer esofágico em humanos e alterações no tubo neural (NTD) (Marasas, 1996, 2001; Missmer et al., 2006; Norred; Vos, 1994; Stack, 1998).



Fumonisins	Empirical formula	Molecular weight	R_3	R_4	R_5	R_6
Fumonisin A_1	$C_{36}H_{61}NO_{16}$	763	OH	OH	$NHCOCH_3$	CH_3
Fumonisin A_2	$C_{36}H_{61}NO_{15}$	747	H	OH	$NHCOCH_3$	CH_3
Fumonisin A_3	$C_{36}H_{61}NO_{15}$	747	OH	H	$NHCOCH_3$	CH_3
Fumonisin B_1	$C_{34}H_{59}NO_{15}$	721	OH	OH	NH_2	CH_3
Fumonisin B_2	$C_{34}H_{59}NO_{14}$	705	H	OH	NH_2	CH_3
Fumonisin B_3	$C_{34}H_{59}NO_{14}$	705	OH	H	NH_2	CH_3
Fumonisin C_1	$C_{33}H_{57}NO_{15}$	707	OH	OH	NH_2	H
Fumonisin P_1	$C_{39}H_{62}NO_{16}$	800	OH	OH	3HP	CH_3
Fumonisin P_2	$C_{39}H_{62}NO_{15}$	784	H	OH	3HP	CH_3
Fumonisin P_3	$C_{39}H_{62}NO_{15}$	784	OH	H	3HP	CH_3

FONTE: Waskiewicz; Beszterda; Golinski, 2012.

Figura 4 - Estrutura química das fumonisinas

As fumonisinas são elaboradas a partir de uma estrutura que é característica da esfinganina, um composto intermediário da biossíntese dos esfingolipídios. Essa semelhança das fumonisinas com a molécula de esfinganina leva alguns autores a acreditar que o seu

mecanismo de ação esteja relacionado com a inibição do metabolismo dos esfingolípidios, pela potente inibição de ceramida sintetase (Wang et al., 1991), uma enzima chave na biossíntese dos esfingolípidios (Riley et. al., 1993).

Os esfingolípidios estão relacionados com diversas funções da célula, tais como: comunicação célula-célula, crescimento, diferenciação e transformação. Assim, a inibição da biossíntese dos esfingolipídeos pode trazer graves consequências (Sweeley, 1991; Wang et al., 1991). Nas fumonisinas, a alanina substitui a serina, enquanto o carbono 18 do acetil-CoA substitui o palmitoil-CoA. (Desjardins et al.,1996).

As fumonisinas são consideradas como possivelmente carcinogênicas para seres humanos (IARC, 1993).

A frequente ocorrência de fumonisinas no milho como também suas implicações, tem incentivado o desenvolvimento de diversas técnicas de separação destas micotoxinas, destacando-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência, apresentando, como vantagens, alta resolução, menor tempo de análise, alta sensibilidade e versatilidade (Dilkin et al., 2001). Muscarella et al. (2008) também relatam e indicam o uso de CLAE com detector de fluorescência para análise de FB_1 e FB_2 em milho e seus subprodutos, com derivatização pós coluna utilizando OPA (ortoftaldeído) e NN-dimetil-2-mercaptoetilamina. O uso de colunas de imunoafinidade para extração e limpeza, tem possibilitado maior especificidade permitindo limites de detecção mais baixos e uso de menor volume de solventes (Shundo, 2004).

Até o presente momento não há uma legislação global para regular os níveis máximos permitidos de fumonisinas no milho e em produtos processados a partir do mesmo. Entretanto, mais de 90 países apresentam regulamentação própria ou níveis máximos tolerados para algumas micotoxinas, dependendo do tipo de matriz (Lino et al., 2004).

Segundo Scott (2012), a Comissão Europeia recomendou, em 2007, limites máximos de 4.000 µg/kg para fumonisinas totais (FB_1 + FB_2) em milho não processado, 1.000 µg/kg em milho e alimentos à base de milho destinados a consumo humano direto, 800 µg/kg em cereais matinais e *snacks* à base de milho e 200 µg/kg em alimentos à base de milho para bebês e crianças.

No Brasil, a recomendação para limites máximos tolerados de FB_1 + FB_2 para milho de pipoca é de 2000 µg/kg (ou 2 µg/g) e para alimentos à base de milho para alimentação infantil é de 200 µg/kg (ou 0,2 µg/g). Em janeiro de 2012, novos alimentos foram adicionados, como a farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha, cujo limite máximo

tolerado é de 2500 µg/kg (ou 2,5 µg/g). Também foram adicionados amido de milho e outros produtos à base de milho, cujo limite máximo tolerado é 2000 µg/kg (ou 2 µg/g). A partir de janeiro de 2014, milho em grão para posterior processamento também foi adicionado à lista, tendo como limite máximo tolerado 5000 µg/kg (ou 5 µg/g) (Resolução – RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011) (Brasil, 2011).

1.4. Controle biológico

O uso intensivo de agrotóxicos para o controle de doenças, pragas e plantas invasoras na agricultura tem, reconhecidamente, promovido diversos problemas de ordem ambiental, como a contaminação dos alimentos, do solo, da água, dos animais; a intoxicação de agricultores; a resistência de patógenos, de pragas e de plantas invasoras a certos princípios ativos dos agrotóxicos; o surgimento de doenças iatrogênicas (as que ocorrem devido ao uso de agrotóxicos). Também tem ocasionado o desequilíbrio biológico, alterando a ciclagem de nutrientes e da matéria orgânica; a eliminação de organismos benéficos e a redução da biodiversidade. Por outro lado, a proteção de plantas por meio do uso de agrotóxicos, apresenta características atraentes, como a simplicidade, a previsibilidade e a necessidade de pouco entendimento dos processos básicos do agro ecossistema para a sua aplicação. Para o sucesso com a aplicação de um fungicida é importante o conhecimento de como aplicar o produto, sendo necessária pouca informação sobre a ecologia e fisiologia de espécies, interações biológicas, ecologia de sistemas, ciclagem de nutrientes, entre outras (Bettiol; Ghini, 2003). Essa simplificação interessa basicamente à comercialização de insumos que interferem em muitas espécies e consequentemente desequilibram o sistema (Bettiol, 2008).

Entretanto, a preocupação da sociedade com o impacto da agricultura no ambiente e a contaminação da cadeia alimentar com agrotóxicos está alterando o cenário agrícola, resultando em alimentos produzidos sem o uso de agrotóxicos ou aqueles com selos que garantem que os agrotóxicos foram utilizados adequadamente. Esses aspectos contribuem para que o uso dos agrotóxicos permeie a agenda ambiental de diversos países (Bettiol, 2008). Dentre as alternativas para a redução do uso de agrotóxicos, o uso do controle biológico é um dos mais discutidos, podendo tanto aproveitar o controle biológico natural quanto realizar a indução de um agente de controle biológico. Desta forma, para a seleção de um bom agente de controle biológico deve-se levar em consideração as interações entre o antagonista e o patógeno, além das condições ambientais que podem influenciar essas interações (Palazzini et al., 2007).

O controle biológico de doenças de plantas pode ser conceituado como sendo o controle de um micro-organismo por meio de outro micro-organismo. Os mecanismos de ação dos antagonistas normalmente envolvidos são: antibiose, competição, parasitismo, predação, hipovirulência e indução de defesa do hospedeiro (Bettiol, 1991).

Sendo assim, o controle biológico tem se mostrado uma estratégia promissora pois além de não causar dano ambiental, pode reduzir a contaminação de grãos por aflatoxinas, tanto em períodos de pré como em pós-colheita (Dorner, 2002). Diversas tecnologias estão sendo desenvolvidas, dentre elas, destacam-se bactérias (Tabela 1), actinobactérias (Tabela 2), leveduras (Tabela 3) e, principalmente, o uso de linhagens de *Aspergillus* não produtoras de aflatoxinas (Bettiol; Morandi, 2009).

Tabela 1 – Linhagens de bactérias disponíveis comercialmente para o controle de fitopatógenos.

Agentes de controle	Linhagens	Nomes comerciais	Empresas
Bacillus subtilis	GB03	Kodiak®	Gustafson
	MBI600	Subtilex®	Becker Underwood
	QST713	Serenade®	AgraQuest
	BD170	BioPro®	Andermatt Bioc.
Pseudomonas chlororaphis	MA342	Cedomon®	BioAgri
	MA342	Cerall®	BioAgri
Pseudomonas fluorescens	A506	Blightban®	Nufarm Inc.
Bacillus pumilus	GB34	YieldShield®	Gustafson
	QST713	Rhapsody®	AgraQuest
	QST2808	Sonata®	AgraQuest
	QST2808	Ballad®	AgraQuest
Bacillus liqueniformis	SB3086	EcoGuard®	Novozymes
Bacillus subtilis + *Bacillus amyloliquefaciens*	GB12+GB99	BioYield®	Gustafson

FONTE: Bettiol e Morandi, 2009

Tabela 2 – Produtos comerciais de controle biológico contendo linhagens de actinobactérias.

Nome comercial	Espécie	Fitopatógeno-alvo	Formulação	Empresa
Actinovate®	*Streptomyces lydicus*	Patógenos de solo	Grânulos solúveis	Natural Industries
Mycostop®	*Streptomyces griseoviridis*	*Fusarium* spp., *Alternaria brassicola*, *Phomopsis* spp., *Botrytis* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp.	Pó	Kemira Agro

FONTE: Gardener e Fravel, 2002 (Adaptado)

Tabela 3 – Espécies de leveduras utilizadas por Hua et al. (1999) para inibição da síntese de aflatoxinas.

Espécie	Linhagem
Candida guilliermondii	WRL-015
Candida kruzei	WRL-038
Candida oleophila	WRL-084
Cryptococcus laurentii	WRL-024
Rhodotorula mucilaginosa	WRL-053
Pichia anomala	WRL-076

FONTE: Hua et al., 1999

A utilização de linhagens de *A. parasiticus* e *A. flavus*, não produtoras de aflatoxinas, ácido ciclopiazônico e de nenhum outro precursor da aflatoxina, vem sendo empregada no campo, diretamente no solo, ao redor da planta em desenvolvimento. Essas linhagens competem pelo mesmo nicho ecológico que as linhagens produtoras de aflatoxinas, no campo. Com tal competição, é esperada uma redução no potencial de inóculo da linhagem aflatoxigênica e, consequentemente, redução na produção de aflatoxina. A linhagem não-aflatoxigênica pode por ventura infectar culturas susceptíveis, como o amendoim e milho. Mas, mesmo com a infecção, não haverá contaminação, pois esta linhagem invasora não produz aflatoxina (Dorner, 2005).

Utilizando esta tecnologia, Dorner et al. (2003) constataram redução significativa dos níveis de aflatoxinas (cerca de 90) em amendoim colhido ao longo de dois anos de cultivo. Da mesma maneira, Cotty e Bhatnagar (1994) demonstraram que uma cepa de *A. flavus*, produtora de muitas enzimas envolvidas na biossíntese da aflatoxina, mas não produtora de aflatoxina, foi

a mais eficiente na redução da contaminação em casa-de-vegetação. Além disso, devido ao melhor entendimento da via de regulação das aflatoxinas, a eficácia dessas cepas competidoras pode ser melhorada por meio de engenharia genética (Bhatnaghar et al., 2006).

1.4.1. Afla-guard®

O Afla-guard®, também considerado agente de biocontrole, tem sido utilizado no controle de micotoxinas, principalmente de aflatoxinas, em lavouras de amendoim e milho (Dorner, 2009). O ingrediente ativo deste produto é uma cepa de *A. flavus* (NRRL 21882) não produtora de toxinas. Este produto (Afla-guard®) consiste em sementes de cevada envolvidas com conídios de *A. flavus* (NRRL 21882) em concentração de 2,93 x 10^5 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama de cevada. O produto é lançado ao solo (equivalente a 1,12g do agente por m^2 de área), ao redor da planta em desenvolvimento. Desta forma, o fungo ali presente passa a competir com os fungos produtores de aflatoxinas e fumonisinas existentes no solo, e acaba por controlar suas populações. Assim, o Afla-guard® tem como objetivo impedir que as populações das linhagens toxigênicas de *Aspergillus* colonizem o substrato, de forma a reduzir a contaminação por aflatoxinas (Biosphere, 2013).

2. PROPOSIÇÃO E OBJETIVOS

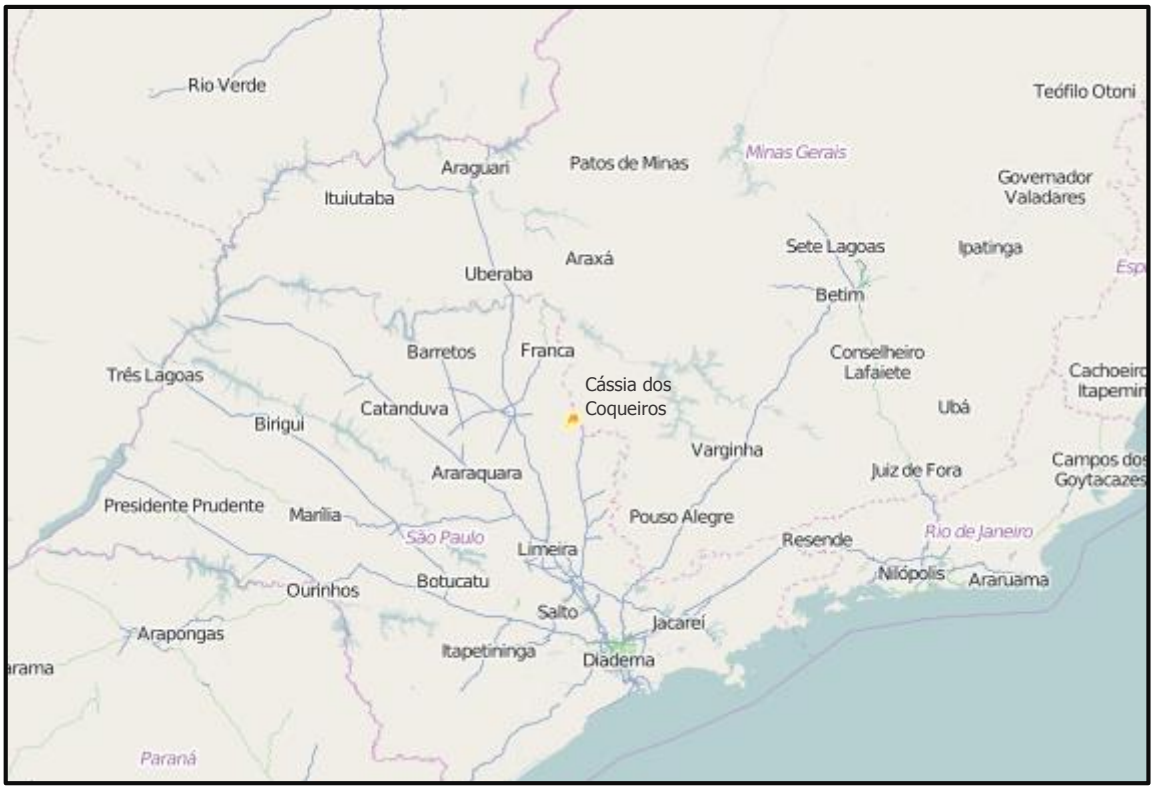
Em termos de produção, a qualidade do milho depende muito de sua variedade e práticas culturais. Sabemos que todos os grãos são expostos, tanto no campo quanto no armazenamento, à ação de fatores físicos, químicos e biológicos, que interagem entre si favorecendo os processos de deterioração, que podem acarretar perdas substanciais na economia e alto risco à saúde humana e animal. Assim, muitas tecnologias tem sido utilizadas para amenizar a deterioração por fungos e uma consequente contaminação por micotoxinas. Dentre elas destacam-se: a utilização de híbridos geneticamente modificados; a implantação de rotação de culturas e o uso de agentes de biocontrole. Com base nessas informações, a presente investigação teve como objetivo geral avaliar a eficácia do Afla-guard® no controle de fungos e de micotoxinas (aflatoxinas e fumonisinas) em milho, no campo. Os objetivos específicos a serem atingidos são os seguintes:

- Determinação da micobiota do ar, do solo e dos grãos de milho na área de plantio antes e após a aplicação do biopesticida;
- Determinação de micotoxinas (aflatoxinas e fumonisinas) nos grãos de milho durante o crescimento da planta, no campo;
- Determinação da atividade de água das amostras de milho e solo;
- Análise do potencial aflatoxigênico dos isolados de *Aspergillus flavus;*
- Correlação dos dados obtidos com os fatores climatológicos (temperatura, umidade relativa do ar, precipitação pluvial);
- Análise estatística dos resultados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local do experimento e caracterização das parcelas

O experimento, utilizando amostras de milho convencional (híbrido AL Avaré-Embrapa), foi conduzido em Cássia dos Coqueiros, estado de São Paulo, localizado a uma latitude 21º16'58" sul, longitude 47º10'11" oeste, e uma altitude de 890 metros (Figura 5). A lavoura de milho foi instalada seguindo as recomendações básicas relativas à exploração das espécies em áreas comerciais, sendo para tanto empregado o espaçamento de 90 cm entre linhas, sob sistema de plantio direto (Figura 6, 7 e 8).



FONTE: IBGE, 2013

Figura 5 - Região de Cássia dos Coqueiros, SP, Brasil

Figura 6 - Área experimental utilizada para plantio do milho.

Figura 7 - Área experimental utilizada para plantio do milho.

Figura 8 - Área experimental utilizada para plantio do milho.

3.2. Produto utilizado

Afla-guard® (Figura 9, 10, 11, 12 e 13), comercializado pela empresa Biosphere Indústria e Comércio de Insumos Agrícolas Ltda, foi o agente de controle utilizado neste estudo.

Figura 9: Afla-guard® ensacado e armazenado.

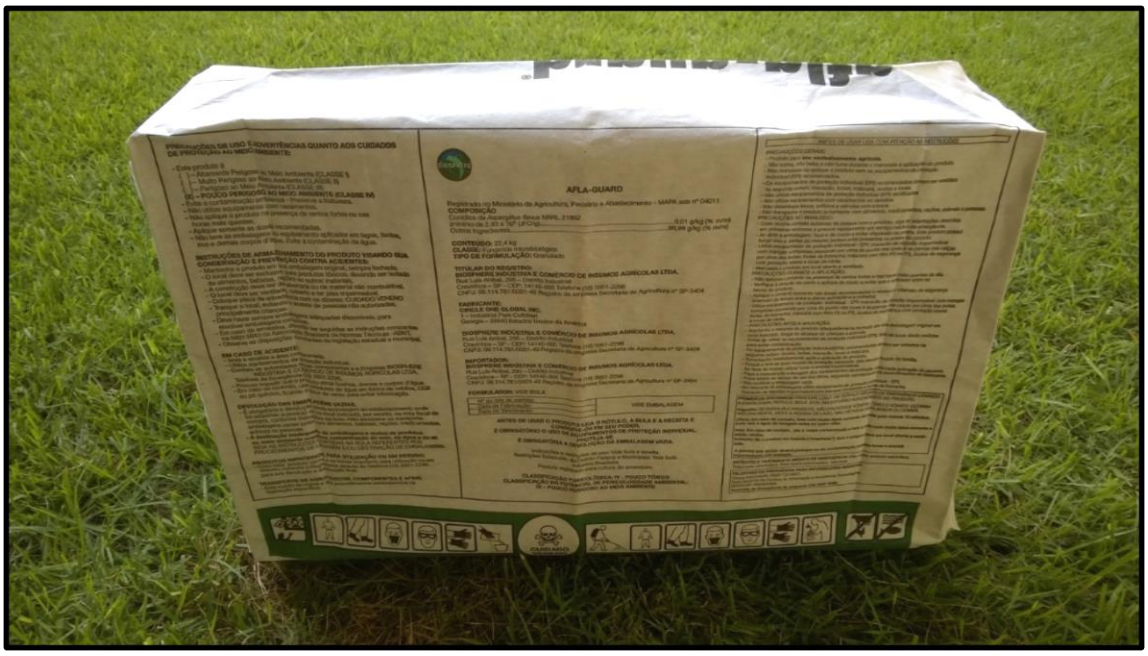
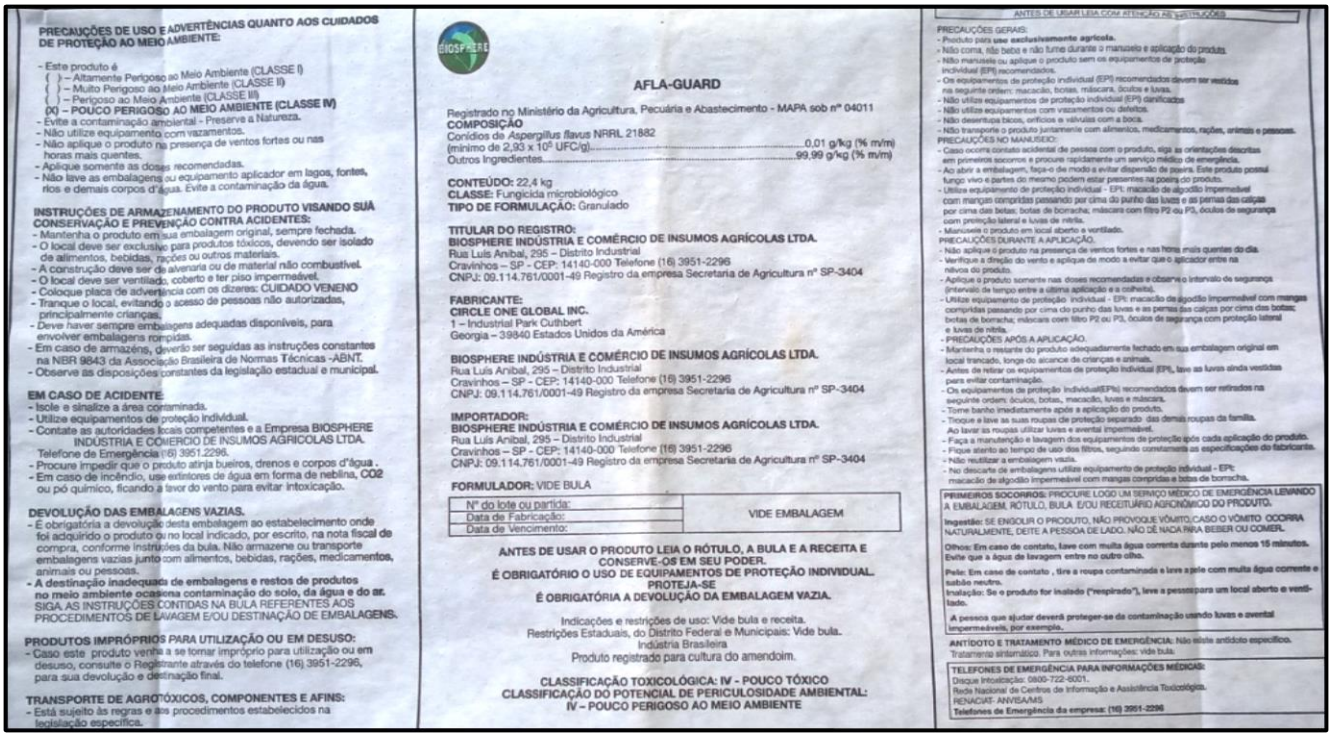


Figura 10: Descrição do produto (Afla-guard®) no verso da embalagem.



PRECAUÇÕES DE USO E ADVERTÊNCIAS QUANTO AOS CUIDADOS DE PROTEÇÃO AO MEIO AMBIENTE:

- Este produto é
  ( ) – Altamente Perigoso ao Meio Ambiente (CLASSE I)
  ( ) – Muito Perigoso ao Meio Ambiente (CLASSE II)
  ( ) – Perigoso ao Meio Ambiente (CLASSE III)
  (X) – POUCO PERIGOSO AO MEIO AMBIENTE (CLASSE IV)
- Evite a contaminação ambiental - Preserve a Natureza.
- Não utilize equipamento com vazamentos.
- Não aplique o produto na presença de ventos fortes ou nas horas mais quentes.
- Aplique somente as doses recomendadas.
- Não lave as embalagens ou equipamento aplicador em lagos, fontes, rios e demais corpos d'água. Evite a contaminação da água.

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO DO PRODUTO VISANDO SUA CONSERVAÇÃO E PREVENÇÃO CONTRA ACIDENTES:

- Mantenha o produto em sua embalagem original, sempre fechada.
- O local deve ser exclusivo para produtos tóxicos, devendo ser isolado de alimentos, bebidas, rações ou outros materiais.
- A construção deve ser de alvenaria ou de material não combustível.
- O local deve ser ventilado, coberto e ter piso impermeável.
- Coloque placa de advertência com os dizeres: CUIDADO VENENO
- Tranque o local, evitando o acesso de pessoas não autorizadas, principalmente crianças.
- Deve haver sempre embalagens adequadas disponíveis, para envolver embalagens rompidas.
- Em caso de armazéns, deverão ser seguidas as instruções constantes na NBR 9843 da Associação Brasileira de Normas Técnicas -ABNT.
- Observe as disposições constantes da legislação estadual e municipal.

EM CASO DE ACIDENTE:

- Isole e sinalize a área contaminada.
- Utilize equipamentos de proteção individual.
- Contate as autoridades locais competentes e a Empresa BIOSPHERE INDÚSTRIA E COMERCIO DE INSUMOS AGRICOLAS LTDA. Telefone de Emergência (16) 3951.2296.
- Procure impedir que o produto atinja bueiros, drenos e corpos d'água .
- Em caso de incêndio, use extintores de água em forma de neblina, CO2 ou pó químico, ficando a favor do vento para evitar intoxicação.

DEVOLUÇÃO DAS EMBALAGENS VAZIAS.

- É obrigatória a devolução desta embalagem ao estabelecimento onde foi adquirido o produto ou no local indicado, por escrito, na nota fiscal de compra, conforme instruções da bula. Não armazene ou transporte embalagens vazias junto com alimentos, bebidas, rações, medicamentos, animais ou pessoas.
- **A destinação inadequada de embalagens e restos de produtos no meio ambiente ocasiona contaminação do solo, da água e do ar.** SIGA AS INSTRUÇÕES CONTIDAS NA BULA REFERENTES AOS PROCEDIMENTOS DE LAVAGEM E/OU DESTINAÇÃO DE EMBALAGENS.

PRODUTOS IMPRÓPRIOS PARA UTILIZAÇÃO OU EM DESUSO:

- Caso este produto venha a se tornar impróprio para utilização ou em desuso, consulte o Registrante através do telefone (16) 3951-2296, para sua devolução e destinação final.

TRANSPORTE DE AGROTÓXICOS, COMPONENTES E AFINS:

- Está sujeito às regras e aos procedimentos estabelecidos na legislação específica.

BIOSPHERE

AFLA-GUARD

Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA sob nº 04011

COMPOSIÇÃO

Conídios de *Aspergillus flavus* NRRL 21882
(mínimo de 2,93 x 10^8 UFC/g).....0,01 g/kg (% m/m)
Outros Ingredientes.....99,99 g/kg (% m/m)

CONTEÚDO: 22,4 kg
CLASSE: Fungicida microbiológico
TIPO DE FORMULAÇÃO: Granulado

TITULAR DO REGISTRO:
BIOSPHERE INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE INSUMOS AGRÍCOLAS LTDA.
Rua Luis Aníbal, 295 – Distrito Industrial
Cravinhos – SP - CEP: 14140-000 Telefone (16) 3951-2296
CNPJ: 09.114.761/0001-49 Registro da empresa Secretaria de Agricultura nº SP-3404

FABRICANTE:
CIRCLE ONE GLOBAL INC.
1 – Industrial Park Cuthbert
Georgia – 39840 Estados Unidos da América

BIOSPHERE INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE INSUMOS AGRÍCOLAS LTDA.
Rua Luis Aníbal, 295 – Distrito Industrial
Cravinhos – SP - CEP: 14140-000 Telefone (16) 3951-2296
CNPJ: 09.114.761/0001-49 Registro da empresa Secretaria de Agricultura nº SP-3404

IMPORTADOR:
BIOSPHERE INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE INSUMOS AGRÍCOLAS LTDA.
Rua Luis Aníbal, 295 – Distrito Industrial
Cravinhos – SP - CEP: 14140-000 Telefone (16) 3951-2296
CNPJ: 09.114.761/0001-49 Registro da empresa Secretaria de Agricultura nº SP-3404

FORMULADOR: VIDE BULA

Nº do lote ou partida:	VIDE EMBALAGEM
Data de Fabricação:	
Data de Vencimento:	

ANTES DE USAR O PRODUTO LEIA O RÓTULO, A BULA E A RECEITA E CONSERVE-OS EM SEU PODER.
É OBRIGATÓRIO O USO DE EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL. PROTEJA-SE
É OBRIGATÓRIA A DEVOLUÇÃO DA EMBALAGEM VAZIA.

Indicações e restrições de uso: Vide bula e receita.
Restrições Estaduais, do Distrito Federal e Municipais: Vide bula.
Indústria Brasileira
Produto registrado para cultura do amendoim.

CLASSIFICAÇÃO TOXICOLÓGICA: IV - POUCO TÓXICO
CLASSIFICAÇÃO DO POTENCIAL DE PERICULOSIDADE AMBIENTAL: IV – POUCO PERIGOSO AO MEIO AMBIENTE

ANTES DE USAR LEIA COM ATENÇÃO AS INSTRUÇÕES

PRECAUÇÕES GERAIS:

- Produto para **uso exclusivamente agrícola.**
- Não coma, não beba e não fume durante o manuseio e aplicação do produto.
- Não manuseie ou aplique o produto sem os equipamentos de proteção individual (EPI) recomendados.
- Os equipamentos de proteção individual (EPI) recomendados devem ser vestidos na seguinte ordem: macacão, botas, máscara, óculos e luvas.
- Não utilize equipamentos de proteção individual (EPI) danificados
- Não utilize equipamentos com vazamentos ou defeitos.
- Não desentupa bicos, orifícios e válvulas com a boca.
- Não transporte o produto juntamente com alimentos, medicamentos, rações, animais e pessoas.

PRECAUÇÕES NO MANUSEIO:

- Caso ocorra contato acidental de pessoa com o produto, siga as orientações descritas em primeiros socorros e procure rapidamente um serviço médico de emergência.
- Ao abrir a embalagem, faça-o de modo a evitar dispersão de poeira. Este produto possui fungo vivo e partes do mesmo podem estar presentes na poeira do produto.
- Utilize equipamento de proteção individual - EPI: macacão de algodão impermeável com mangas compridas passando por cima do punho das luvas e as pernas das calças por cima das botas; botas de borracha; máscara com filtro P2 ou P3, óculos de segurança com proteção lateral e luvas de nitrila.
- Manuseie o produto em local aberto e ventilado.

PRECAUÇÕES DURANTE A APLICAÇÃO.

- Não aplique o produto na presença de ventos fortes e nas horas mais quentes do dia.
- Verifique a direção do vento e aplique de modo a evitar que o aplicador entre na nêvoa do produto.
- Aplique o produto somente nas doses recomendadas e observe o intervalo de segurança (intervalo de tempo entre a última aplicação e a colheita).
- Utilize equipamento de proteção individual - EPI: macacão de algodão impermeável com mangas compridas passando por cima do punho das luvas e as pernas das calças por cima das botas; botas de borracha; máscara com filtro P2 ou P3, óculos de segurança com proteção lateral e luvas de nitrila.

PRECAUÇÕES APÓS A APLICAÇÃO.

- Mantenha o restante do produto adequadamente fechado em sua embalagem original em local trancado, longe do alcance de crianças e animais.
- Antes de retirar os equipamentos de proteção individual (EPI), lave as luvas ainda vestidas para evitar contaminação.
- Os equipamentos de proteção individual(EPIs) recomendados devem ser retirados na seguinte ordem: óculos, botas, macacão, luvas e máscara.
- Tome banho imediatamente após a aplicação do produto.
- Troque a lave as suas roupas de proteção separado das demais roupas da família. Ao lavar as roupas utilizar luvas e avental impermeável.
- Faça a manutenção e lavagem dos equipamentos de proteção após cada aplicação do produto.
- Fique atento ao tempo de uso dos filtros, seguindo constantemente as especificações do fabricante.
- Não reutilizar a embalagem vazia.
- No descarte de embalagens utilize equipamento de proteção individual - EPI: macacão de algodão impermeável com mangas compridas e botas de borracha.

PRIMEIROS SOCORROS: PROCURE LOGO UM SERVIÇO MÉDICO DE EMERGÊNCIA LEVANDO A EMBALAGEM, RÓTULO, BULA E/OU RECEITUÁRIO AGRONÔMICO DO PRODUTO.

Ingestão: SE ENGOLIR O PRODUTO, NÃO PROVOQUE VÔMITO. CASO O VÔMITO OCORRA NATURALMENTE, DEITE A PESSOA DE LADO. NÃO DÊ NADA PARA BEBER OU COMER.

Olhos: Em caso de contato, lave com muita água corrente durante pelo menos 15 minutos. Evite que a água de lavagem entre no outro olho.

Pele: Em case de contato , tire a roupa contaminada e lave a pele com muita água corrente e sabão neutro.

Inalação: Se o produto for inalado ("respirado"), leve a pessoa para um local aberto e ventilado.

A pessoa que ajudar deverá proteger-se da contaminação usando luvas e avental impermeáveis, por exemplo.

ANTÍDOTO E TRATAMENTO MÉDICO DE EMERGÊNCIA: Não existe antídoto específico. Tratamento sintomático. Para outras informações: vide bula.

TELEFONES DE EMERGÊNCIA PARA INFORMAÇÕES MÉDICAS:
Disque Intoxicação: 0800-722-6001.
Rede Nacional de Centros de Informação e Assistência Toxicológica.
RENACIAT- ANVISA/MS
Telefones de Emergência da empresa: (16) 3951-2296

Figura 11: Descrição do produto (Afla-guard®) no verso da embalagem.

Figura 12: Afla-guard® separado para ser lançado ao solo do tratamento (tamanho original).

Figura 13: Semente de cevada envolvida com conídios de *A. flavus* não-toxigênico (NRRL 21882), após ser lançado ao solo.

3.3. Amostragens de milho, solo, ar e delineamento experimental

Para amostragem das parcelas experimentais foi utilizada a metodologia proposta por Delp et al. (1986). O milho foi plantado no dia 10 de novembro de 2012.

A região do plantio foi dividida em uma área contendo 500m^2, formada por 10 parcelas uniformes de 80 m^2, conforme apresentado na Figura 14. Para cada coleta foram escolhidas, ao acaso, 5 parcelas e de cada uma dessas parcelas foram colhidas 10 espigas de milho de uma mesma linha de semeadura. Após o terceiro período de coleta (80 dias após o plantio) foram coletadas 5 amostras de milho das áreas tratadas, totalizando 15 amostras, e 1 da área controle, totalizando 3.

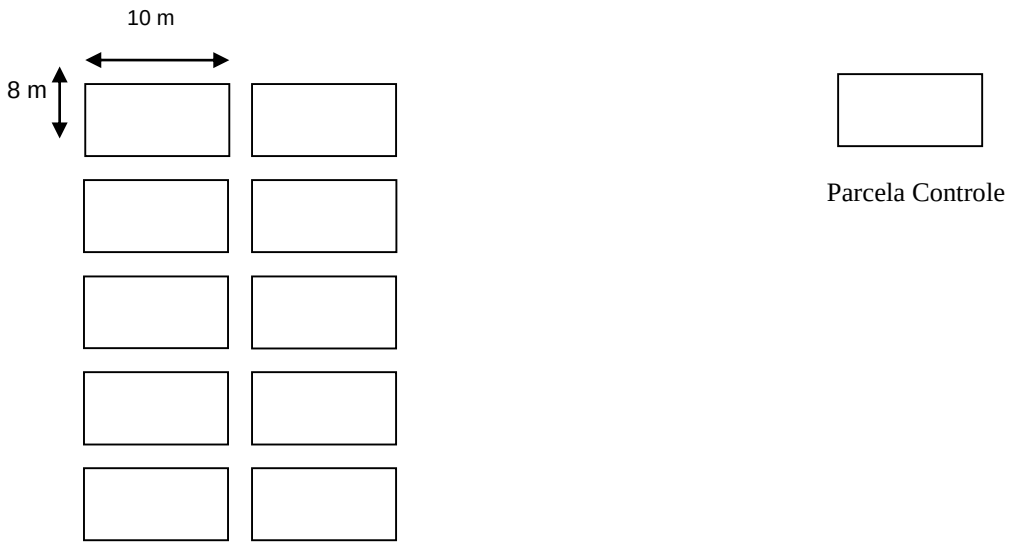


Figura 14 - Croqui da área experimental

As coletas foram realizadas nos seguintes períodos: 1) Antes do plantio (antes da aplicação do Afla-guard®); 2) 60 dias após o plantio (momento da aplicação do Afla-guard®); 3) 80 dias após o plantio (20 dias após a aplicação do Afla-guard®); 4) 120 dias após o plantio (60 dias após a aplicação do Afla-guard®); 5)150 dias após o plantio (90 dias após a aplicação do Afla-guard®) **(colheita).**

Amostras de solo (25 das áreas tratadas 3 e da área controle) foram obtidas na profundidade de 0-20 cm, resultante de 10 pontos, em toda área utilizada para o plantio, perfazendo uma amostra composta que, após homogeneização, resultou em uma única amostra.

Para a amostragem de fungos do ar, ao início de cada coleta, foram sorteadas 5 parcelas (a partir da 3ª coleta, adicionamos a parcela de Controle Negativo), as quais foram obtidas amostras em duplicata de dois pontos de cada parcela, totalizando 4 amostras por parcela. Estas

amostragens foram realizadas por meio do Aparelho Monitor de ar (T-air, Millipore), representado na Figura 12.

Figura 15 - Aparelho Monitor de Ar (T-air, Millipore)

3.4. Coletas

Tabela 4 - Coletas realizadas e o nº de amostras obtidas para a determinação da micobiota e das micotoxinas

Coletas	Micobiota			Micotoxinas	
	Ar	Solo	Milho	Fumonisinas	Aflatoxinas
1ª	20*	5*	-	-	-
2ª	20*	5*	-	-	-
3ª	24*	6*	6*	6*	6*
4ª	24*	6*	6*	6*	6*
5ª	24*	6*	6*	6*	6*
Total	**112***	**28***	**18***	**18***	**18***

***= número de amostras**

1ª = antes da aplicação do Afla-guard® (antes do plantio do milho) - 15/10/2012

2ª = 60 dias após o plantio (momento da aplicação do Afla-guard®) – 10/01/2013

3ª = 80 dias após o plantio (20 dias após a aplicação) – 30/01/2013

4ª = 120 dias após o plantio (60 dias após a aplicação) - 10/03/2013

5ª= 150 dias após o plantio (90 dias após a aplicação) – colheita – 10/04/2013

3.5. Isolamento de fungos do ar

Para isolamento dos fungos do ar, utilizamos o equipamento coletor de ar, que se baseia na quantificação da sedimentação, por m^3 de ar, dos conídios suspensos na atmosfera, em placas de petri contendo Ágar Sabouraud. Tais amostragens foram realizadas nos mesmos momentos em que o solo foi coletado. Após a coleta, as placas foram incubadas a 25 ºC de 3 a 5 dias (Figura 13).

Figura 16 – Placas coletadas pelo T-air Millipore, após a incubação

3.6. Determinação da atividade de água

Os níveis de atividade de água (Aa) das amostras de solo e de grãos de milho foram determinados por meio do equipamento Aqualab CX-2 (Decagon Devices Inc.), representado na Figura 17. As amostras foram acondicionadas no recipiente de medida e as Aa mensuradas em duplicata, utilizando o método do ponto de orvalho. Esse método consiste em uma câmara que contém um espelho. A amostra foi colocada em um recipiente no interior da câmara. Aguarda-se certo tempo até que o equilíbrio seja atingido. O espelho é resfriado por um elemento termoelétrico eletrônico (Peltier). Com o resfriamento, gotas de água condensada se formarão na superfície do espelho, que serão determinadas por uma célula fotoelétrica. Um sensor infravermelho mede a temperatura da amostra, um ventilador acelera o processo de modo que o equilíbrio é atingido mais rapidamentee um microprocessador interno usa os dados da temperatura para calcular a Aa (Ditchfield, 2000).

Figura 17: Equipamento Medidor de Atividade de água (Aqualab CX-2).

3.7. Determinação da micobiota das amostras de solo

Para a determinação da micobiota das amostras de solo, foi utilizada a técnica de diluição seriada e plaqueamento superficial (Pitt; Hocking, 1997). De cada amostra de solo, foram retirados 10 g e diluídos em 90 mL de água destilada esterilizada, obtendo-se diluição de 10^{-1}. A partir desta, foram preparadas diluições decimais e sucessivas até 10^{-6}. Foram retirados 0,1 mL de cada diluição e plaqueados. As placas contendo meio Martin (1950), foram incubadas a 25 °C por aproximadamente 5 dias.

Após a incubação, foi feita a contagem das colônias multiplicando-se o número obtido pelo fator de diluição, a fim de se obter o número de unidades formadoras de colônia por grama de substrato. Colônias de diferentes tipos morfológicos foram isoladas e identificadas a nível de gênero por métodos morfológicos clássicos (Pitt; Hocking, 1997). Entretanto, as espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* foram identificadas através de método molecular (sequenciamento do DNA ribossomal).

3.8. Determinação da micobiota das amostras de milho

Para as amostras de milho, foi utilizada a técnica de desinfecção superficial e semeadura direta proposta por Berjak (1984), de cada uma das sub-amostras (1kg) de grãos de milho, previamente homogeneizadas, foram retiradas aproximadamente 30 g para desinfecção em solução de hipoclorito de sódio 0,4% por 3 minutos, seguida de lavagens vigorosas com água destilada esterilizada para eliminação dos contaminantes externos. Após a desinfecção, 33 grãos foram selecionados ao acaso e semeados diretamente em 3 placas de Petri contendo Ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol (DRBC) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) (Pitt; Hocking, 2009). Cada placa contendo 11 grãos foi incubada a 25 ºC por 5 dias (Figura 18) e os resultados expressos em porcentagem do total de grãos semeados. As colônias de diferentes tipos morfológicos foram isoladas em Ágar Batata Dextrose (Oxoid) e submetidas à identificação morfológica através da técnica de microcultivo (Riddell, 1950). Os fungos foram classificados em nível de gênero, utilizando metodologia morfológica clássica, de acordo com Pitt e Hocking (2009). Entretanto aqueles pertencentes ao gênero *Fusarium* foram identificados até espécie utilizando metodologia molecular, empregando o sequenciamento parcial do gene do fator de elongação 1α, utilizando os primers EF-1 e EF-2, como descrito por Geiser et al. (2004).

Figura 18 - Placas contendo Grãos de Milho, após incubação

3.9. Sequenciamento de DNA dos isolados fúngicos

As espécies de *Fusarium* foram confirmadas através de sequenciamento da região entre os nucleotídeos 75 a 978 do gene fator de elongação 1α (baseando-se na sequência de *Trichoderma reesei*, Genebank Acession Number Z23012). Para as cepas classificadas como FNE (Fungos Não Esporulados) foi utilizado o sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal. Já as espécies de *Aspergillus* foram identificadas por sequenciamento das regiões ITS do DNA ribossomal (Glass; Donaldson, 1995) e de um segmento do gene calmodulina (Carbone; Khon, 1999).

Foram utilizados os seguintes primers: EF1 e EF2, para identificação dos isolados *Fusarium* spp.; ITS1 e ITS4, para os isolados de *Aspergillus* spp. e FNE; CMD42 e CMD637, para os isolados de *Aspergillus* spp. (Tabela 5).

Tabela 5: Primers utilizados para o sequenciamento e suas respectivas sequências.

Primers	***Forward Primer (5´ - 3´)***	***Reverse Primer (3´- 5´)***
EF1 e EF2	ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC	GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT
ITS1 e ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCG	TCCTCCGCTTATTGATAT
CMD42 e CMD637	GGCCTTCTCCCTATTCGTAA	CTCGCGGATCATCTCATC

O DNA ribossomal foi extraído e purificado diretamente das colônias fúngicas a partir do cultivo em ágar YES (Abdollahi; Buchanan, 1981; Degola et al., 2007), seguindo o kit do protocolo PrepMan Ultra® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Em seguida, o DNA total extraído foi diluído 50 x (98 μL de água Milli-Q e 2 μL do DNA da amostra) e posteriormente quantificado em NanoDrop 2000 C (Thermo Scientific Waltham, Massachusetts, EUA). No caso dos isolados de *Aspergillus* fragmentos da região ITS e seguimentos do gene calmodulina, foram amplificados, já no caso dos isolados de *Fusarium* spp., fragmentos do gene fator de elongação 1α foram também amplificados. Com relação aos FNE, somente fragmentos da região ITS do DNA ribossomal, foram amplificados. Para a PCR, foram utilizados microtubos de 0,2 mL, utilizando os seguintes reagentes: 12,5 μL Master Mix® (Promega, Madison, WI); 2,0 μL de cada um dos *primers* [os *primers* utilizados foram sintetizados pela IDT (Integrated DNA Technologies, Illinois, EUA)]; 2,0 μL de DNA diluído

a 40 ng/ µL; 6,5 µL de água Milli-Q, totalizando volume final de 25 µL. A amplificação do DNA foi realizada em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Byosistems, Gouda, Holanda). Para os isolados de *Aspergillus* spp., o programa para a amplificação incluiu a desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, temperatura de anelamento de 57 °C (ITS) e 54 °C (CMD). No caso dos isolados de *Fusarium* spp., o aparelho foi programado com ciclo inicial de 94 °C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 30 seg, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1 min; 72 °C por 7 min.

Após a PCR, os produtos foram purificados com o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, Hilden, Alemanha) e estocados a -20 °C até serem sequenciados. Desta forma, os produtos de PCR foram sequenciados utilizando os mesmos primers que foram empregados na amplificação. O kit Big Dye Terminator v3.1. Cycle Sequencing (Applied Biosystems) foi usado para o sequenciamento das amostras, e as reações foram corridas 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems). Sequências consenso foram obtidas e editadas utilizando o programa Sequencher 5.1 (Ann Arbor, MI, EUA), as quais foram então alinhadas, utilizando a ferramenta *BLAST*, através das sequências depositadas no *GeneBank* (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) e no *Fusarium* ID v1.0 (http://isolate.fusariumdb.org/index.php) (Geiser et al., 2004).

3.10. Determinação de micotoxinas das amostras de milho

Todos os solventes utilizados nas etapas de determinação de micotoxinas do milho foram grau cromatográfico. A água Milli-Q foi produzida em nosso departamento utilizando o equipamento de purificação de água: Academic System (Millipore, Marlborough, MA, EUA).

3.10.1. Otimização dos métodos para detecção de micotoxinas

Os métodos para determinação de micotoxinas das amostras de milho e da potencialidade toxigênica das cepas de *Aspergillus* Seção *Flavi* foram previamente testados e otimizados. Com essa finalidade, foram avaliados os seguintes parâmetros: porcentagem de recuperação, repetibilidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

3.10.1.1. LD e LQ

A determinação do LD foi baseada nas normas da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) de 1999, onde foi utilizado como a concentração mais baixa que possa ser determinado sendo diferente a partir de uma amostra branca, ou seja, livre da micotoxina estudada. Os valores estimados da LD foram baseados na relação de cinco vezes o ruído de linha de base e determinado por análise das soluções padrão de cada analito, diminuindo as concentrações até ao nível mínimo detectável. O LQ foi definido como o nível acima do qual os resultados quantitativos podem ser obtidos com um grau de confiança especificado (IUPAC, 1999). O LQ foi determinado por análise das soluções padrão de cada micotoxina, diminuindo as concentrações até o nível mais baixo quantificado com precisão e exatidão aceitável. Os LD e LQ foram realizados através da inoculação de solução padrão contendo as aflatoxinas B_1 e B_2 ou fumonisinas FB_1 e FB_2 para os grãos de milho. Após evaporação do solvente em que o padrão estava ressuspendido, procedeu-se a extração, limpeza e separação por CLAE. O método de quantificação foi através de curva de calibração.

3.10.1.2. Testes de recuperação de micotoxinas e repetibilidade

De acordo com o Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO, 2003), a porcentagem de recuperação expressa a precisão de uma metodologia, sendo estimada pela adição de quantidades conhecidas do analito em uma determinada amostra. Repetibilidade é utilizada para avaliar a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, e em condições definidas. Para os testes de recuperação, foram utilizadas amostras previamente analisadas e que apresentaram níveis de micotoxinas não detectada.

Para os testes de recuperação para aflatoxinas, foi inoculada soluções-padrão correspondente à concentração de 10 µg/kg de cada aflatoxina em 5g de milho. Após, executaram-se as etapas de extração, limpeza, derivatização e separação por CLAE (seção 3.8.3.). Foram calculados os percentuais de recuperação para cada aflatoxina e os respectivos coeficientes de variação da recuperação.

No que diz respeito às fumonisinas, a recuperação foi realizada da seguinte forma: em 20 g de amostras de grãos de milho foram adicionados soluções-padrão de fumonisinas, em

triplicata, nas seguintes concentrações: 15,0 μg/kg, 25,0 μg/kg, 50,0 μg/kg, 85,0 μg/kg, 150,0 μg/kg e 300,0 μg/kg para FB_1 e 15,0 μg/kg, 25,0 μg/kg, 50,0 μg/kg, 85,0 μg/kg 150,0 μg/kg e 300,0 μg/kg para FB_2. Em seguida, as amostras foram submetidas à metodologia proposta por Visconti et al. (2001).

3.10.1.3. Curvas de calibração para aflatoxinas

A quantificação das aflatoxinas foi realizada através de curva de calibração construída a cada lote (batch). As curvas de calibração para as aflatoxinas, com 5 pontos e em quintuplicata, foram realizadas injetando-se soluções derivatizadas dos padrões nas concentrações de 0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10 ng/mL para cada aflatoxina. Essas concentrações correspondem aos valores de 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 μg/kg, respectivamente.

3.10.1.4. Curva de calibração para fumonisinas

A quantificação das fumonisinas foi realizada através de curva de calibração, resultante de 6 pontos, em triplicata. Para tanto, foi construída uma curva de calibração para cada fumonisina (FB_1 e FB_2), nas concentrações de 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0 μg/mL.

3.10.2. Determinação de fumonisinas em amostras de milho

Foram transferidos para um frasco 20 g de cada amostra previamente triturada e adicionados 50 mL de acetonitrila:metanol:água (25:25:50, v/v/v). Após agitação por 20 minutos, em agitador mecânico horizontal, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante filtrado em papel de filtro (Whatman nº 4, 12 cm). As operações foram repetidas novamente para o precipitado, e os filtrados recolhidos. Foram pipetados 10 mL do filtrado, adicionados 40 mL de tampão fosfato (PBS) pH 7,0 e agitados. Os extratos diluídos foram filtrados em papel de filtro de microfibra e, em seguida, coletados 10 mL para a purificação em coluna de imunoafinidade. Após a filtragem, um volume de 10 mL foi submetido à purificação através de coluna de imunoafinidade com fluxo de 2-3 mL por minuto.

Posteriormente, a coluna foi lavada com 10 mL de PBS (tampão fosfato, pH 7,0) para a retirada de resíduos. As fumonisinas foram eluídas com 1,5 mL de metanol grau CLAE, evaporadas até resíduo e mantidas a – 20 °C até o momento da detecção e quantificação. O resíduo foi redissolvido em 200 µL de acetonitrila:água (50:50, v/v). Uma alíquota de 50 µL do extrato da amostra foi diluída em 50 µL do reagente OPA (40 mg de ortoftaldeído dissolvidos em 1 mL de metanol, diluídos em 5 mL de solução 0,1M de tetraborato de sódio, acrescidos de 50 µL de 2-mercaptoetanol e mantidos a temperatura ambiente sob abrigo da luz). A solução foi agitada por 30 segundos, e após 2 minutos da adição do reagente OPA, foi injetada no cromatógrafo líquido (Shimadzu, modelo LC-10AD, equipado com injetor e "loop" fixo de 20 µL, Rheodyne). Após a separação em coluna de fase reversa C-18 (5 ODS-20, 150 x 4,6 mm, Phenomenex), as fumonisinas foram detectadas em detector de fluorescência (modelo RF-10AXL), em comprimentos de onda de 335 e 440 nm (excitação e emissão respectivamente). Como fase móvel, utilizou-se acetonitrila:água:ácido acético (480:520:5, v/v/v). A foi será de 1,0 mL/min, temperatura da coluna de 30 °C.

3.10.3. Determinação de aflatoxinas em amostras de milho

Utilizando a metodologia proposta por Tanaka (2002) e Lebret (2004), as amostras foram trituradas e homogeneizadas, e 2,5 g de cada amostra de milho foram transferidos para um tubo de polipropileno com fundo cônico (tipo Falcon) de 50 mL, adicionou-se 12,5 mL de solução acetonitrila:água (85:15, v/v). Os tubos foram submetidos a agitador vórtex por 1 minuto e, posteriormente, a agitador mecânico horizontal durante 60 minutos. Os tubos foram centrifugados a 10000 rpm durante 3 minutos. Cinco mililitros do sobrenadante foram, então, transferidos para outro tubo de polipropileno (tipo Falcon) de 50 mL e adicionados 45 mL de água acidificada com ácido acético glacial a 0,5%. O tubo foi, então, agitado vigorosamente. A partir desta solução foi realizada a extração em fase sólida, utilizando cartucho Strata C18-E 500 mg/3 mL, previamente condicionado com 3 mL de metanol e 6 mL de água acidificada 0,5%. A solução foi submetida completamente a fluxo de 1 gota/segundo, com auxílio de bomba a vácuo. Após esta etapa, a limpeza foi realizada pela adição de 12 mL de água acidificada e a eluição das aflatoxinas foi feita com 1 mL de metanol em frasco âmbar. O metanol foi evaporado a resíduo e os frascos foram armazenados a -4 ºC até o momento da derivatização química. A derivatização química dos extratos, utilizando ácido trifluoracético

(TFA) e hexano (Stubblefield, 1986), foi realizada com a finalidade de aumentar os sinais cromatográficos das AFB_1 e AFG_1, transformando-as em AFB_2a e AFG_2a, respectivamente, confirmando a identidade química desses compostos. Assim, o procedimento foi realizado pela adição de 200 µL de hexano e 100 µL TFA, os frascos foram incubados a 40 ºC por 15 minutos e, a seguir, a solução derivatizante foi evaporada sob nitrogênio. Após esse processo, as amostras foram ressuspendidas em 500 µL de solução metanol: água (1:1, v/v) e 100 µL de cada amostra foram injetados. A separação das aflatoxinas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), tendo como fase móvel isocrática, baseada em trabalho de Scott et al. (1990), composta por água:acetonitrila:metanol (8:1,5:1,5 v/v/v) acrescido de 0,1% TFA a um fluxo de 1 mL/min. O equipamento utilizado para separação dos compostos foi o cromatógrafo líquido de alta eficiência - Prominence da marca Shimadzu (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão), modelo LC 20, com coluna analítica de fase reversa C18 Shim-Pack VP-ODS 5 µm 150L X 4,6 (Shimadzu) e cartucho de pré-coluna Shim-Pack GVP-ODS 10 X 4,6 (Shimadzu), acoplada em forno CTO-20A com temperatura constante de 40 °C. Foi utilizado detector de fluorescência RF 10 AXL (365 nm de excitação e 450 nm de emissão), com injetor automático de volume variável de 1 a 100 µL. O cromatógrafo foi conectado ao computador através do módulo de interface CBM 20A. Para análise dos resultados foi utilizado o programa LC Solution (Shimadzu). Os padrões de aflatoxinas B_1, B_2, G_1 e G_2 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) utilizados nas análises foram ressuspendidos em solução de benzeno:acetonitrila (98:2, v/v) e quantificados em espectrofotômetro DU-640 (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA). A partir da concentração encontrada, foi realizada diluição a 1 µg/mL de cada aflatoxina. A partir dessa solução foram realizadas as diluições para uso nas atividades propostas.

3.10.4. Avaliação do potencial toxigênico dos isolados de *A. flavus*

Todas os isolados de *A. flavus* obtidos durante o estudo foram avaliados quanto à potencialidade para produção de aflatoxinas, utilizou-se, para essa finalidade, a metodologia preconizada por Lin e Dianese (1976). Um inóculo de cada colônia de *Aspergillus*, obtido do cultivo de 7 dias em PDA a 25 °C, foi semeado em meio de cultivo ágar coco e incubado a 25 °C por 15 dias. Após esse período, todo o conteúdo da placa foi transferido para frasco erlenmeyer de 250 mL e a cada 10 g da cultura com o ágar foi acrescida de 30 mL de

clorofórmio. Os frascos foram submetidos a agitador mecânico horizontal durante 30 minutos. Os extratos clorofórmicos foram filtrados em papel de filtro para frascos âmbares. Os filtrados foram evaporados até resíduo em banho-maria (60 ºC) e armazenados a -4 ºC até a realização da cromatografia. Foi realizada triagem através de cromatografia em camada delgada (CCD) com os extratos ressuspendidos em 1 mL de clorofórmio e aplicados 10 µL de cada extrato em cromatofolha de sílica gel G60 (Merck, Darmstadt, Alemanha). A cromatografia foi realizada em cuba cromatográfica contendo como fase móvel solução saturada de clorofórmio:acetona (9:1, v/v). Após a separação, as cromatofolhas foram secas em capela de exaustão e observadas em sala escura sob luz UV com comprimento de onda (λ) de 360 nm. As manchas das amostras foram comparadas as dos padrões de aflatoxinas (AFB_1 e AFB_2) de acordo com o Rf dos padrões. A quantificação das aflatoxinas foi realizada por CLAE. Para essa finalidade, cada extrato foi ressuspendido em 2 mL de clorofórmio e uma alíquota de 100 µL desta solução foi transferida para outro frasco âmbar e evaporada até resíduo. A partir daí, o extrato foi ressuspedido em 3 mL de solução de acetonitrila:água (85:15,v/v), agitado em vórtex durante 1 minuto e diluído em 27 mL de água acidificada (0,5% ácido acético glacial) e novamente agitada. A partir desta solução foi realizada a extração em fase sólida, utilizando cartucho de sílica Strata C18-E 500 mg/3 mL, conforme metodologia descrita para as amostras de milho (seção 3.8.3.).

3.11. Análise dos fatores climatológicos de Cássia dos Coqueiros

Dados referentes à temperatura mínima e máxima (°C) e à quantidade de chuvas por metro quadrado (índice pluviométrico - mm) da região durante todo o período do experimento (outubro/2012 a abril/2013) foram coletados diariamente na Estação Meteorológica automatizada próxima ao local do experimento, sob a responsabilidade do Portal Agrometeorológico e Hidrológico do Estado de São Paulo.

3.12. Análise estatística

Para a análise estatística foi realizado a correlação entre a micobiota existente na área em que o afla-guard® foi aplicado e na área de controle, assim como analisados entre os substratos

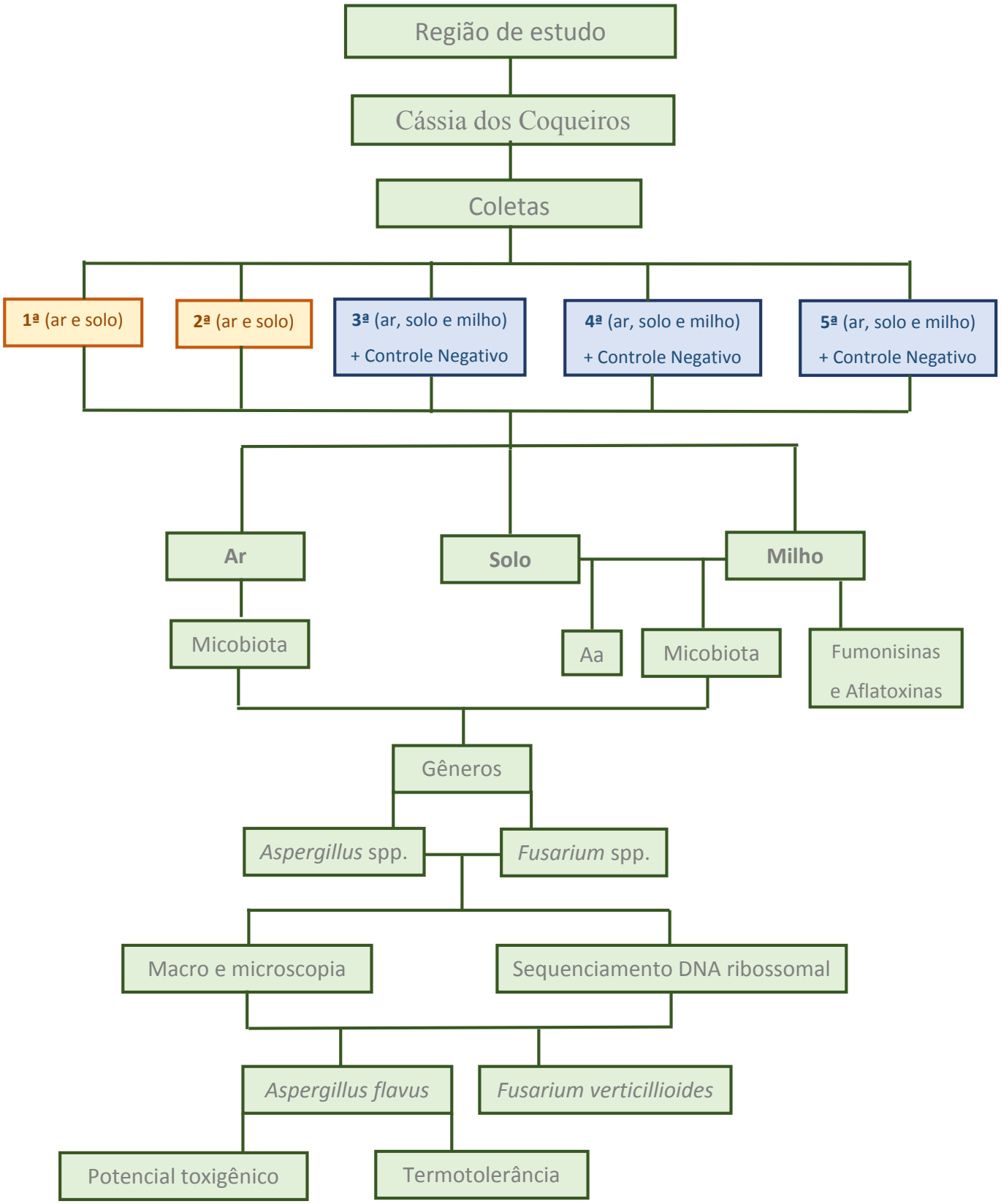
em que foram isolados os fungos (ar, solo e milho). Da mesma maneira foi feito com os resultados obtidos da atividade de água do solo e milho das duas áreas (tratamento e controle), bem como com as micotoxinas (fumonisinas e aflatoxinas) determinadas nas duas áreas.

Para a análise da variável micobiota foi feito a análise da variância de forma que as preposições dessa análise foram verificadas e a comparação de médias feitas pelo teste de Tukey. Foi preciso fazer a transformação logarítmica da variável UFC+1 devido a problemas de heterogeneidade da variância e pontos discrepantes.

O modelo utilizado foi: UFC = μ + Controle + Tratamento + Substrato + Tratamento + Substrato + Constante Média Geral.

Para as variáveis Aa e micotoxinas, a análise também foi realizada pelo teste de Tukey e o modelo utilizado foi: Variável (Aa e Micotoxinas)= μ + Controle + Tratamento + Substrato + Tratamento + Substrato + Constante Média Geral

4. FLUXOGRAMA



Legenda:

Antes da aplicação do produto Depois da aplicação do produto

5. RESULTADOS

Para cada coleta, foram escolhidas, aleatoriamente, as parcelas de estudo. A saber:

Tabela 6: Coletas, Parcelas e Micobiota

Coletas	Parcelas	Micobiota
1ª	1; 4; 5; 7 e 10	Ar e solo
2ª	2; 3; 6; 8 e 9	Ar e solo
3ª	2; 3; 5; 7; 9 e CN*	Ar, solo e milho
4ª	1; 4; 6; 8; 10 e CN	Ar, solo e milho
5ª	2; 3; 5; 7; 9 e CN	Ar, solo e milho

* CN= Controle Negativo

5.1. Micobiota do ar

Das 112 amostras do ar (4 amostras por parcela, 5 coletas), foram isolados os seguintes fungos, em ordem decrescente de Unidades Formadoras de Colônia, por metro cúbico de ar (UFC/m^3) (Tabela7):

5.1.1. 1ª coleta (somatória das 5 parcelas)

Trichoderma spp. (1.025 UFC/m^3), *Cladosporium* spp. (87,2 UFC/m^3), *Neurospora* spp. (68,5 UFC/m^3), *Epicoccum* spp. (65,7 UFC/m^3), *Fusarium solani* (51 UFC/m^3), *A. niger* (30,5 UFC/m^3), *F. solani* (27,7 UFC/m^3), *Rhizopus* spp. (23,2 UFC/m^3), ,*Mucor* spp. (19,7 UFC/m^3), *Acremonium* spp. (19,5 UFC/m^3), *Phoma* spp. (1,75 UFC/m^3), *Penicillium* spp. (1,5 UFC/m^3), *F. graminearum* (0,8 UFC/m^3), *Eurotium* spp. (0,25 UFC/m^3).

5.1.2. 2ª coleta (somatória das 5 coletas)

Cladosporium spp. (294,7 UFC/m^3), *Epicoccum* spp. (62 UFC/m^3), *Nigrospora* spp. (7 UFC/m^3), *Acremonium* spp. (5,25 UFC/m^3), *Phoma* spp. (4 UFC/m^3), *F. solani* (2,8 UFC/m^3), *Mucor* spp. (0,25 UFC/m^3), *GFSC** (5,75 UFC/m^3).

**Giberella Fugikuroi Species Complex*.

5.1.3. 3ª coleta (somatória das 5 parcelas + controle)

Cladosporium spp. (1.215,6 UFC/m^3), *Phoma* spp. (156,25 UFC/m^3), *Trichoderma* spp. (56,75 UFC/m^3), *Mucor* spp. (1,5 UFC/m^3), *GFSC** (0,25 UFC/m^3), *Pestalotiopsis* spp. (0,5 UFC/m^3), *A. flavus* (0,25 UFC/m^3).

**Giberella Fugikuroi Species Complex*

Parcela controle: *Cladosporium* spp. (787 UFC/m3), *Epicoccum* spp. (48,25 UFC/m^3).

5.1.4. 4ª coleta (somatória das 5 parcelas + controle)

F. solani (330,75 UFC/m^3), *Cladosporium* (190, 25 UFC/m^3), *F. graminearum* (30,0 UFC/m^3), *Acremonium* spp. (8,25 UFC/m^3), *Epicoccum* (126,75 UFC/m^3), *Pestalotiopsis* spp. (231,0 UFC/m^3), *Mucor* spp. (3,5 UFC/m3), *Nigrospora* spp. (3 UFC/m^3), *Penicillium* spp. (0,5 UFC/m^3), *Alternaria* spp. (0,25 UFC/m^3), *A. flavus* (2,75 UFC/m^3)

Parcela Controle: *Alternaria* spp. (38,5 UFC/m^3), *Nigrospora* spp. (35,75 UFC/m^3), *Cladosporium* spp. (23 UFC/m^3), *F. graminearum* (14,25 UFC/m^3), *Epicoccum* spp. (4 UFC/m^3), *A. flavus* (0,5 UFC/m^3), *Rhizopus* (0,25 UFC/m^3).

5.1.5. 5ª coleta (somatória das 5 parcelas + controle)

Epicoccum spp. (225,5 UFC/m^3), *Cladosporium* spp. (444,5 UFC/m^3), *Eurotium* (82,75 UFC/m^3),*Alternaria* spp. (76 UFC/m^3), *F. andyiazi* (58 UFC/m^3), *Cochliobolus* spp. (47,75 UFC/m^3), *F. solani* (39,25 UFC/m^3) *Phoma* spp. (16,25 UFC/m^3),

Parcela Controle: *Cladosporium* spp. (95 UFC/m^3), *F. solani* (67,5 UFC/m^3), *F. verticillioides* (18 UFC/m^3), *Epicoccum* spp. (4 UFC/m^3).

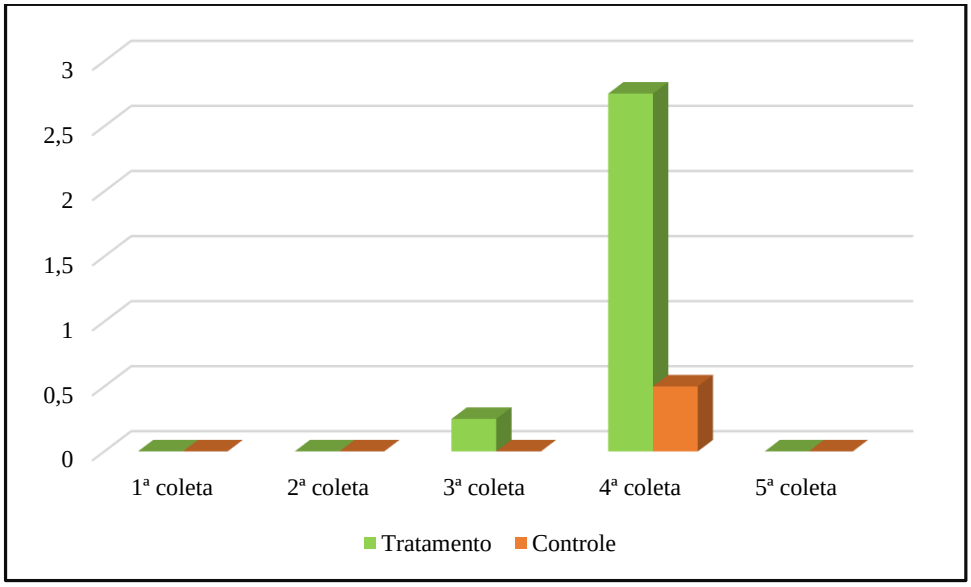
Tabela 7 - Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por metro cúbico de ar (m^3) das amostras coletadas do ar, no decorrer das coletas.

Fungos	**1C**	**2C**	**3C**	**3CCN [2]**	**4C**	**4CCN [3]**	**5C**	**5CCN [4]**
Cladosporium spp.	87,2	294,7	1.215,6	787	190,25	23	444,5	95
Trichoderma spp.	1.025	-	56,75	-	-	-	-	-
Epicoccum spp.	65,7	62	-	48,25	126,75	4	225,5	4
Mucor spp.	19,7	0,25	1,5	-	-	-	-	-
Rhizopus spp.	23,2	-	-	-	-	0,25	-	-
Neorospora spp.	68,5	-	-	-	-	-	-	-
F. solani	27,7	2,8	-	-	330,65	-	39,25	67,5
A. niger	30,5	-	-	-	-	-	-	-
Eurotium spp.	0,25	-	-	-	-	-	82,75	-
Acremonium spp.	19,5	5,25	-	-	8,25	-	-	-
Phoma spp.	1,75	4	156,25	-	-	-	16,25	-
Nigrospora spp.	-	7	-	-	3	35,75	-	-
GFSC [1]	-	5,75	0,25	-	-	-	-	-
F. oxysporum	-	-	-	-	-	-	-	-
Pestalotiopsis spp.	-	-	0,5	-	231	-	-	-
A. flavus	-	-	0,25	-	2,75	0,5	-	-
F. graminearum	0,8	-	-	-	30	14,25	-	-
Penicillium spp.	1,5	-	-	-	0,5	-	-	-
Alternaria spp.	-	-	-	-	-	38,5	-	-
Cochliobolus spp.	-	-	-	-	-	-	47,75	-
F. adyiazi	-	-	-	-	-	-	58	-
F. verticillioides	-	-	-	-	-	-	-	18

[1]*GFSC*: Complexo de espécies *Giberella fugikuroi* | [2] 3CCN: Controle Negativo da 3ª coleta | [3] 4CCN: Controle Negativo da 4ª coleta | [4] 5CCN: Controle Negativo da 5ª coleta

O gráfico a seguir demonstra a frequência de *A. flavus* (UFC/m^3) no isolamento de fungos do ar.

Gráfico 1 – Número de UFC/ m^3 de ar de *A. flavus*



5.2. Micobiota do solo e atividade de água

A média da atividade de água (Aa) do solo foi de 0,99 para todas as parcelas e coletas. Das 28 amostras, foram isolados os seguintes fungos, em ordem decrescente de Unidades Formadoras de Colônia, por grama de substrato (UFC/g) (Tabela 8):

5.2.1. 1ª coleta (somatória das 5 parcelas)

Penicillium spp. (331 x 10^3 UFC/g), *Cladosporium* spp. (42 x 10^3 UFC/g), *GFSC** (10 x 10^3 UFC/g), *Nigrospora* spp. (10 x 10^3 UFC/g), *Eurotium* spp. (13 x 10^3 UFC/g), *F. solani* (40 x 10^3 UFC/g), *Trichoderma* spp. (36 x 10^3 UFC/g), *Phoma* spp (12 x 10^3 UFC/g), *F. verticillioides* (10 x 10^3 UFC/g), *Mucor* spp. (11 x 10^3 UFC/g), *Gongronella* spp. (30 x 10^3 UFC/g), *Epicoccum* spp. (13 x 10^3 UFC/g), *F. graminearum* (10 x 10^3 UFC/g), *Rhizopus* spp. (12 x 10^3 UFC/g), *Alternaria* spp. (10 x 10^3 UFC/g).

5.2.2. 2ª coleta (somatória das 5 parcelas)

Penicillium spp. (12,3 x 10^3 UFC/g), *Myrothecium* spp. (2,1 x 10^3 UFC/g), *Rhizopus* spp. (7 x 10^3 UFC/g), *GFSC** (3 x 10^3 UFC/g), *Trichoderma* spp. (10 x 10^3 UFC/g), *F. verticillioides* (12 x 10^3 UFC/g), *F. incarnatum* (1 x 10^3 UFC/g).

5.2.3. 3ª coleta (somatória das 5 parcelas + controle)

Penicillium spp. (26 x 10^3 UFC/g), *F. verticillioides (*5 x 10^3 UFC/g), *Epicoccum* spp. (17 x 10^3 UFC/g), *Trichoderma* spp. (1 x 10^3 UFC/g), *Rhizopus* spp. (1 x 10^3 UFC/g), *Clonostachys* spp. 4 x 10^3 UFC/g), *F. graminearum* (2 x 10^3 UFC/g), *F. solani* (1 x 10^3 UFC/g), *A. flavus* (2 x 10^3 UFC/g), *Nigrospora* spp. (1 x 10^3 UFC/g), *Exophiala* spp. (1 x 10^3 UFC/g).

Parcela controle: *Rhizopus* spp. (1 x 10^3 UFC/g).

5.2.4. 4ª coleta (somatória das 5 parcelas + controle)

Penicillium spp. (55 x 10^3 UFC/g), *Trichoderma* spp. (4 x 10^3 UFC/g), *Mortierella* spp. (3 x 10^3 UFC/g). *F. oxysporum* (7 x 10^3 UFC/g), *F. verticillioides* (2 x 10^3 UFC/g), *Cladosporium* spp. (10 x 10^3 UFC/g), *A. flavus* (8 x 10^3 UFC/g), *F. oxysporum* (7 x 10^3 UFC/g), *Phoma* spp. (1 x 10^3 UFC/g), *Epicoccum* spp. (5 x 10^3 UFC/g), *Mucor* spp. (1 x 10^3 UFC/g).

Parcela controle: *Trichoderma* spp. (5 x 10^3 UFC/g), *Penicillium* spp. (2 x 10^3 UFC/g), *Rhizopus* spp. (2 x 10^3 UFC/g).

5.2.5. 5ª coleta (somatória das 5 parcelas + controle)

Trichoderma spp. (4 x 10^3 UFC/g), *F. verticillioides* (4 x 10^3 UFC/g), C*ladosporium* spp. (3 x 10^3 UFC/g), *Eurotium* spp. (28 x 10^3 UFC/g), *Penicillium* spp. (12 x 10^3 UFC/g), *Mucor* spp. (6 x 10^3 UFC/g), *Rhizopus* spp. (1 x 10^3 UFC/g), *F. oxysporum* (1 x 10^3 UFC/g), *Mortierella* spp. (1 x 10^3 UFC/g), *A. flavus* (3 x 10^3 UFC/g), *F. solani* (7 x 10^3 UFC/g), *F. graminearum* (1 x 10^3 UFC/g),

Parcela controle: *Penicillium* spp. (4 x 10^3 UFC/g), *Trichoderma* spp. (4 x 10^3 UFC/g), *Rhizopus* spp. (3 x 10^3 UFC/g), *F. solani* (1 x 10^3 UFC/g).

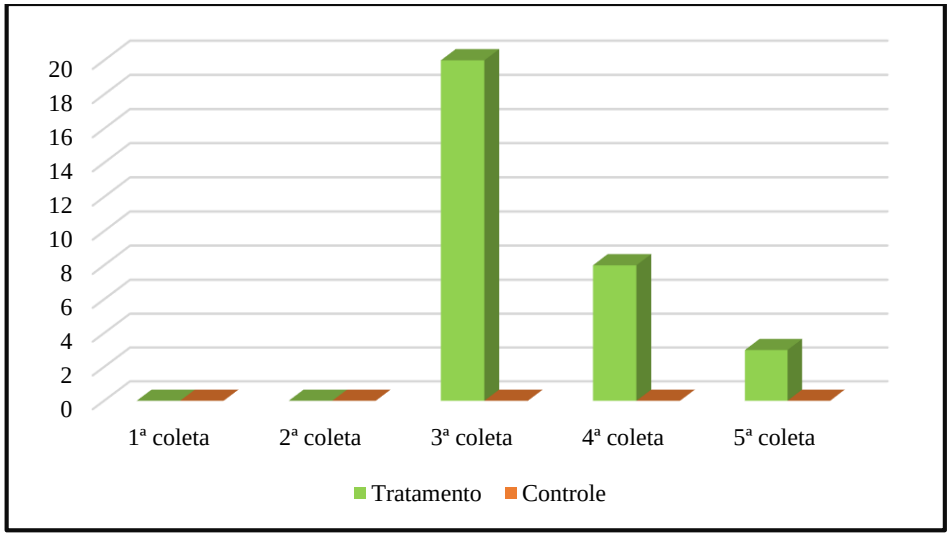
Tabela 8 - Número de UFC/g x 10^3 (Unidades Formadoras de Colônia por grama de substrato, multiplicado pelo fator de diluição 10^3) e Aa (Atividade de água) média das amostras de solo.

Fungos	**1C**	**2C**	**3C**	**3CCN [2]**	**4C**	**4CCN [3]**	**5C**	**5CCN [4]**
Penicillium spp.	331	12,3	26	-	55	2	12	4
Cladosporium spp.	42	-	-	-	10	-	3	-
Trichoderma spp.	36	10	1	-	4	5	4	4
F. solani	40	-	1	-	-	-	7	1
GFSC [1]	10	3	-	-	-	-	-	-
Rhizopus spp.	12	7	1	1	-	2	1	3
F. verticillioides	10	12	5	-	2	-	4	-
Mucor spp.	11	-	-	-	1	-	6	-
Eurotium spp.	13	-	-	-	-	-	28	-
Phoma spp.	12	-	-	-	1	-	-	-
F. graminearum	10	-	2	-	-	-	1	-
Epicoccum spp.	13	-	17	-	17	-	-	-
A. flavus	-	-	2	-	2	-	3	-
F. oxysporum	-	-	-	-	7	-	1	-
Mortierella spp.	-	-	-	-	3	-	1	-
F. incarnatum	-	1	-	-	-	-	-	-
Neorospora spp.	-	-	-	-	-	-	-	-
Gongronella spp.	30	-	-	-	-	-	-	-
Alternaria spp.	10	-	-	-	-	-	-	-
Myrotecium spp.	-	2,1	-	-	-	-	-	-
Clonostachys spp.	-	-	4	-	-	-	-	-
Exophiala spp.	-	-	1	-	-	-	-	-
Nigrospora spp.	-	-	1	-	-	-	-	-
Aa média	0,998	0,997	0,997	0,994	0,996	0,998	0,997	0,997

[1] *GFSC*: Complexo de espécies *Giberella fugikuroi* | [2] 3CCN: Controle Negativo da 3ª coleta | [3] 4CCN: Controle Negativo da 4ª coleta | [4] 5CCN: Controle Negativo da 5ª coleta

O gráfico 2 apresenta o grau de contaminação (nº de UFC/g x 10^3) por *A. flavus* nas amostras de solo nas 5 coletas realizadas..

Gráfico 2 - Número de UFC/g x 10^3 de *A. flavus* na micobiota do solo (UFC/g x10^3)



5.3. Micobiota do milho e atividade de água

A média da atividade de água dos grãos variou de 0,95 a 0,99. Nas amostras de milho do grupo tratado constatou-se a predominância de *F. verticillioides*, em todas as coletas, com valores médios de 3,1 % (3ª coleta), 23,6 % (4ª coleta), 27,2 % (5ª coleta). A presença de *A. flavus* foi detectada, nas áreas tratadas com produto, na 4ª coleta, com freqüência média de 0,6% . No grupo controle, sem tratamento, *F. verticillioides* foi isolado somente na 5ª coleta com freqüência de 78,8%. Neste grupo não houve isolamento de *A. flavus*. Na totalidade das amostras analisadas foram isolados os seguintes fungos, em ordem decrescente de frequência (Gráfico 3 e Tabela 9).

5.3.1. 3ª coleta

Parcela 2: *A. versicolor* (3,03%), *Mucor* spp. (3,03%).

Parcela 3: *A. versicolor* (3,03%), *F. verticillioides* (3,03%).

Parcela 5: *F. verticillioides* (9,09%), *A. versicolor* (3,03%), *Mucor* spp. (3,03%), *Stachybotrys* spp. (3,03%).

Parcela 7: *A. versicolor* (3,03%), *A. sydowii* (3,03%).

Parcela 9: *F. verticillioides* (3,03%), *Penicillium* spp. (3,03%), *Trichoderma* spp. (3,03%).

Parcela controle: *Acremonium* spp. (3,03%), *A. versicolor* (3,03%).

5.3.2. 4ª coleta

Parcela 1: *F. verticillioides* (54,54%), *Acremonium* spp. (9,09%), *F. solani* (3,03%).

Parcela 4: *F. verticillioides* (18,18%), *F. meridionale* (3,03%), *Acremonium* spp. (3,03%).

Parcela 6: *Acremonium* spp. (18,18%), *F. verticillioides* (12,12%), *F. solani* (6,06%), *A. flavus* (3,03%).

Parcela 8: *F. verticillioides* (15,15%), *A. flavus* (3,03%).

Parcela 10: *F. verticillioides* (18,18%), *Acremonium* spp. (6,06%), *Trichoderma* spp. (3,03%).

Parcela controle: *Acremonium* spp. (12,12%), *F. equiseti* (3,03%), *Ceratobasidium* spp. (3,03%).

5.3.3. 5ª coleta

Parcela 2: *Trichoderma* spp. (51,51%), *Penicillium* spp. (27,27%), *Talaromyces* spp. (15,15%), *F. verticillioides* (9,09%).

Parcela 3: *Talaromyces* spp. (45,45%), *F. verticillioides* (24,24%), *Penicillium* spp. (21,21%).

Parcela 5: *Talaromyces* spp. (63,63%), *Fusarium verticillioides* (24,24%), *Penicillium* spp. (9,09%), *F. solani* (3,03%).

Parcela 7: *Talaromyces* spp. (45,45%), *F. verticillioides* (30,30%), *Penicillium* spp. (21,21%).

Parcela 9: *F. verticillioides* (48,48%), *Penicillium* spp. (24,24%), *Talaromyces* spp. (12,12%), *F. solani* (3,03%), *F. oxysporum* (3,03%).

Parcela controle: *F. verticillioides* (78,78%) *Trichoderma* spp. (21,21%).

Gráfico 3 - Isolados fúngicos mais frequentes no milho em que foi aplicado o agente de biocontrole

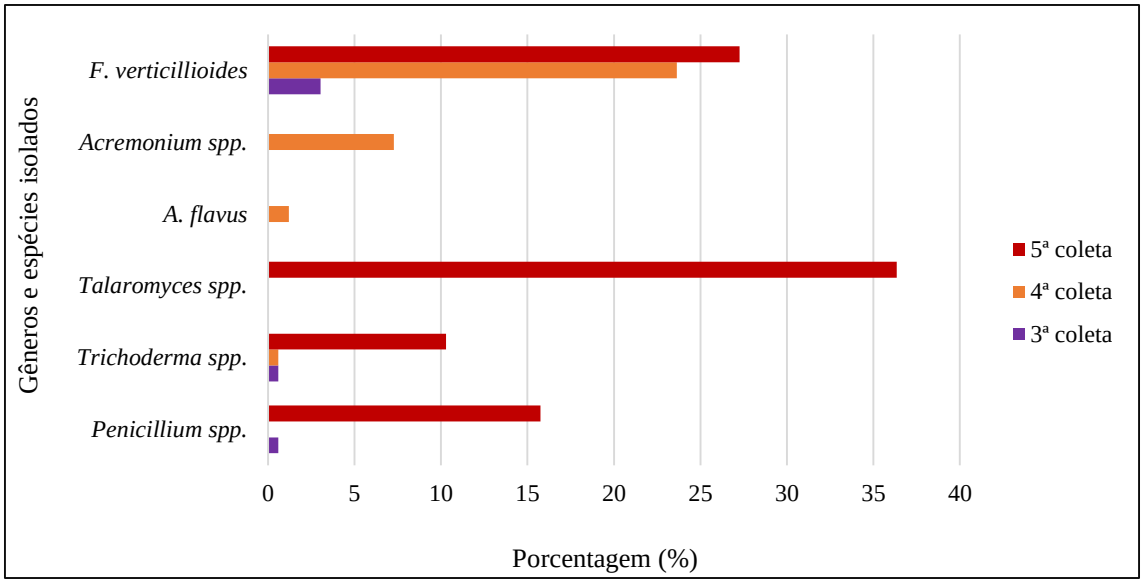


Gráfico 4: Isolados fúngicos mais frequentes no milho do grupo controle.

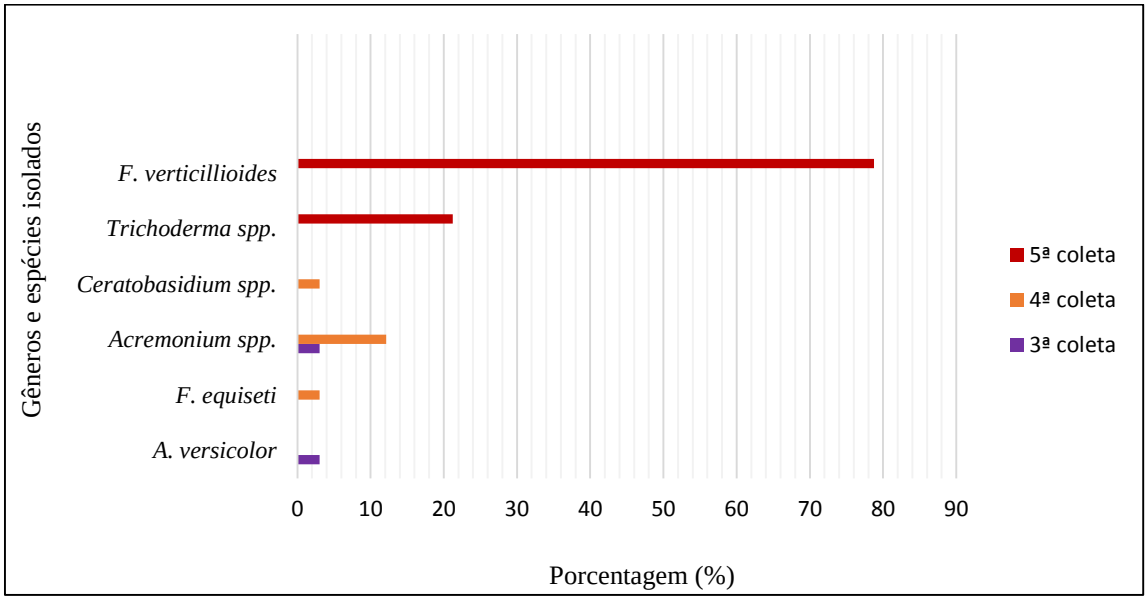


Tabela 9 – Frequência (%) de fungos isolados e Aa (Atividade de água) média das amostras de milho.

Fungos	3C	3CCN [1]	4C	4CCN [2]	5C	5CCN [3]
Fusarium verticillioides	15,15	-	23,63	-	27,27	78,78
Fusarium solani	-	-	1,81	-	1,21	-
Aspergillus versicolor	12,12	3,03	-	-	-	-
Fusarium equiseti	-	-	-	0,6	-	-
Acremonium spp.	-	3,03	7,27	2,42	-	-
Mucor spp.	3,03	-	-	-	-	-
Aspergillus flavus	-	-	1,21	-	-	-
Trichoderma spp.	-	-	0,6	-	10,3	4,24
Talaromyces spp.	-	-	-	-	36,36	-
Penicillium spp.	-	-	-	-	20,6	-
Aspergillus sydowii	3,03	-	-	-	-	-
Stachybotrys spp.	3,03	-	-	-	-	-
Fusarium meridionale	-	-	-	-	-	-
Ceratobasidium spp.	-	-	-	0,6	-	-
Aa média	0,986	0,993	0,975	0,962	0,953	0,948

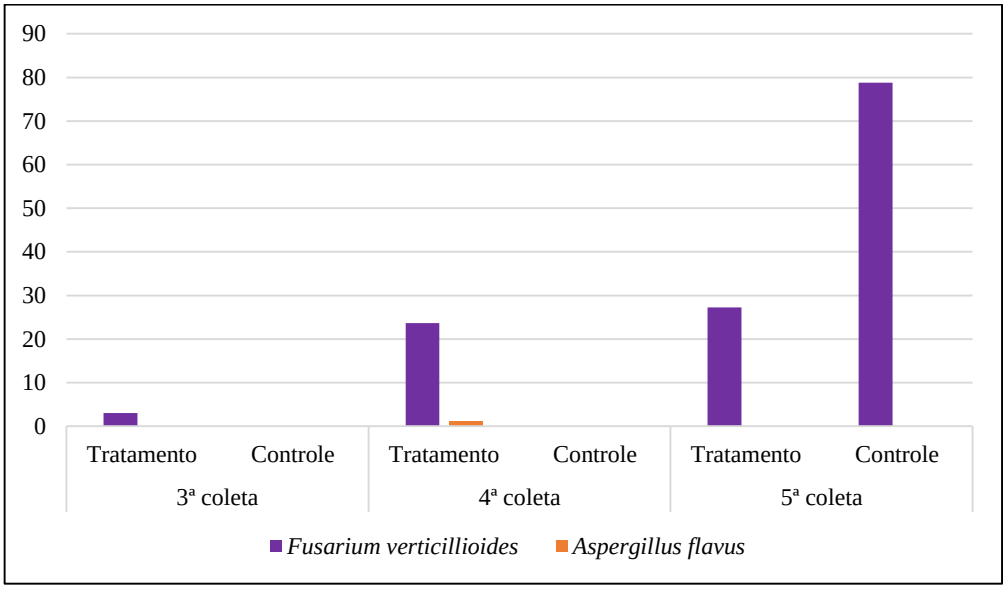
[1] 3CCN: Controle Negativo da 3ª coleta | [2] 4CCN: Controle Negativo da 4ª coleta | [3] 5CCN: Controle Negativo da 5ª coleta

A tabela e o gráfico a seguir (Tabela 10 e Gráfico 5) relaciona a frequência de isolamento de *A. flavus* e *F. verticillioides* nas amostras de milho do tratamento:

Tabela 10 - Ocorrência de *F. verticillioides* e *A. flavus* na micobiota do milho onde foi aplicado o agente de biocontrole.

Coletas	*Fusarium verticillioides*	*Aspergillus flavus*
3ª	3,03%	-
4ª	23,63%	1,21%
5ª	27,27%	-

Gráfico 5 - Frequência (%) de isolamento dos fungos *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* no milho



5.4. Identificação das espécies dos gêneros *Fusarium* e *Aspergillus* por metodologia clássica e molecular

A identificação morfológica dos 136 isolados de *Fusarium* spp. oriundas de amostras do ar, solo e grãos de milho, foi realizada através da visualização das características macroscópicas e microscópicas. Estes isolados também foram submetidos ao sequenciamento parcial do gene do fator de elongação 1α. Foram isoladas 9 espécies diferentes, a saber: *F. verticillioides* (70,6%), *F. solani* (10,3%), *F. graminearum* (7,35%), Complexo de espécies *Giberella fugikuroi* (5,88%), *F. oxysporum* (2,94%), *F. equiseti* (0,73%), *F. incarnatum* (0,73%), *F. andiyazi* (0,73%), *F. bulbicola* (0,73%).

Foram isoladas da micobiota do ar, solo e grãos, 20 cepas de *Aspergillus* spp., que também foram identificadas através da visualização das características macroscópicas, microscópicas e moleculares (sequenciamento da região ITS e de parte do gene da calmodulina). Quatro diferentes espécies foram isoladas. São elas: *A. flavus* (60%), *A. versicolor* (25%), *A. niger* (10%), *A. sydowii* (5%).

5.5. Avaliação da metodologia analítica para determinação das fumonisinas B_1 e B_2

As curvas de calibração, utilizadas para a quantificação das fumonisinas B_1 e B_2, aplicadas nas análises das amostras de milho apresentaram-se lineares nas faixas de concentrações. O coeficiente de correlação para as curvas de calibração foi de 0,999 tanto para FB_1 quanto para FB_2.

Análises de fumonisinas, utilizando colunas de imunoafinidade, revelou limite de quantificação para FB_1 e FB_2 de 15,0 µg/kg (ppb). Os limites de detecção foram de 9,7 µg/kg para ambas fumonisinas, sendo determinado como a concentração onde a área do pico se encontrava três vezes acima da linha de base padrão.

A recuperação do método foi testada em triplicata, a partir de amostras livres de fumonisinas (nas condições do nosso experimento) e artificialmente contaminadas com FB_1 e FB_2 em seis diferentes níveis de contaminação (entre 15,0 e 300,0 µg/kg). Os testes de recuperação apresentaram resultados médios de 94,1% para FB_1 e 95,1% para FB_2.

As quantificações das toxinas, quando presentes, foram realizadas através de curva de calibração. Os tempos de retenção para FB_1 e FB_2 foram de 7 e 18 minutos, respectivamente.

5.6. Determinação de fumonisinas nas amostras de milho

A pesquisa de fumonisinas realizada em 18 amostras de grãos de milho (15 amostras tratadas e 3 amostras controle), revelou a presença da toxina em 5 amostras tratadas e em 2 amostras controle. Foram detectadas as seguintes concentrações (µg/kg) (Tabelas 4,5 e 6).

5.6.1. 3ª coleta

Tabela 11 - Concentração (µg/kg) de fumonisinas nas amostras de milho da 3ª coleta

Amostra	Fumonisinas (FB_1 e FB_2)
Parcela 2	nd*
Parcela 3	nd
Parcela 5	nd
Parcela 7	nd
Parcela 9	FB_1: 38,6 µg/kg - FB_2: 1,6 µg/kg
Parcela controle	nd

* nd = não detectado

5.6.2. 4ª coleta

Tabela 12 - Concentração (µg/kg) de fumonisinas nas amostras de milho da 4ª coleta

Amostra	Fumonisinas (FB_1 e FB_2)
Parcela 1	nd*
Parcela 4	nd
Parcela 6	FB_1: 450,3 µg/kg - FB_2: 124,3 µg/kg
Parcela 8	FB_1: 118,2 µg/kg - FB_2: 85,6 µg/kg
Parcela 10	FB_1: 242,7 µg/kg - FB_2: 80,16 µg/kg
Parcela controle	FB_1: 452,55 µg/kg - FB_2: 136,77 µg/kg

* nd = não detectado

5.6.3. 5ª coleta

Tabela 13 - Concentração (µg/kg) de fumonisinas nas amostras de milho da 5ª coleta

Amostra	Fumonisinas (FB_1 e FB_2)
Parcela 2	nd*
Parcela 3	nd
Parcela 5	FB_1: 57,77 µg/kg - FB_2: 17,26 µg/kg
Parcela 7	nd
Parcela 9	nd
Parcela controle	FB_1: 181,9 µg/kg - FB_2: 28 µg/kg

* nd = não detectado

5.7. Avaliação da metodologia analítica para determinação das aflatoxinas B_1 e B_2

Os coeficientes de recuperação obtidos foram para aflatoxinas B_1, 80,44% e B_2, 83,28%. Os tempos de retenção foram 7 e 14 minutos (± 5%) para AFB_1 e AFB_2, respectivamente. Os limites de quantificação e detecção para todas as aflatoxinas foram 1,5 µg/kg e 0,75 µg/kg, respectivamente.

5.8. Determinação de aflatoxinas nas amostras de milho

A pesquisa de aflatoxinas foi realizada em 18 amostras de grãos de milho. Na 3ª e 5ª coleta de milho, aflatoxinas não foram detectadas em nenhuma amostra. Na 4ª coleta detectamos as seguintes concentrações (µg/kg) (Tabelas 7 e 8).

5.8.1. 4ª coleta

Tabela 14 - Concentração (µg/kg) de aflatoxinas nas amostras de milho da 4ª coleta

Amostra	Aflatoxinas (AFB_1 e AFB_2)
Parcela 1	nd*
Parcela 4	nd
Parcela 6	AFB_1: 0,8 µg/kg - AFB_2: nd
Parcela 8	nd
Parcela 10	nd
Parcela controle	AFB_1: 1,8 µg/kg - AFB_2: nd

* nd = não detectado

5.9. Avaliação do potencial toxigênico dos isolados de *A. flavus*

O potencial toxigênico dos 13 isolados de *A. flavus*, principal espécie produtora de aflatoxinas, verificou que 30,8% (4/13) foram capazes de produzir AFB_1 e AFB_2, destes, 2 isolados foram provenientes do ar, 1 das amostras de solo e 1 das amostras de milho, todos da área de tratamento. Os níveis de AFB_1 variou de 19,9 ng/g a 4 ng/g, já os níveis de AFB_2 foram de 2,07 ng/g a 0,01 ng/g. 69,2% (9/13) dos isolados de *Aspergillus flavus* não são aflatoxigênicos.

5.10. Estudo da termotolerância dos isolados de *A. flavus*

O estudo de termotolerância demonstrou que todos os isolados cresceram vigorosamente em 7 dias às temperaturas de 25 e 37 °C, com crescimento médio de 53,5 e 38 mm,

respectivamente. Por outro lado, os isolados testados a 42 °C tiveram crescimento médio de 3 mm.

5.11. Análise dos fatores climatológicos da região de Cássia dos Coqueiros

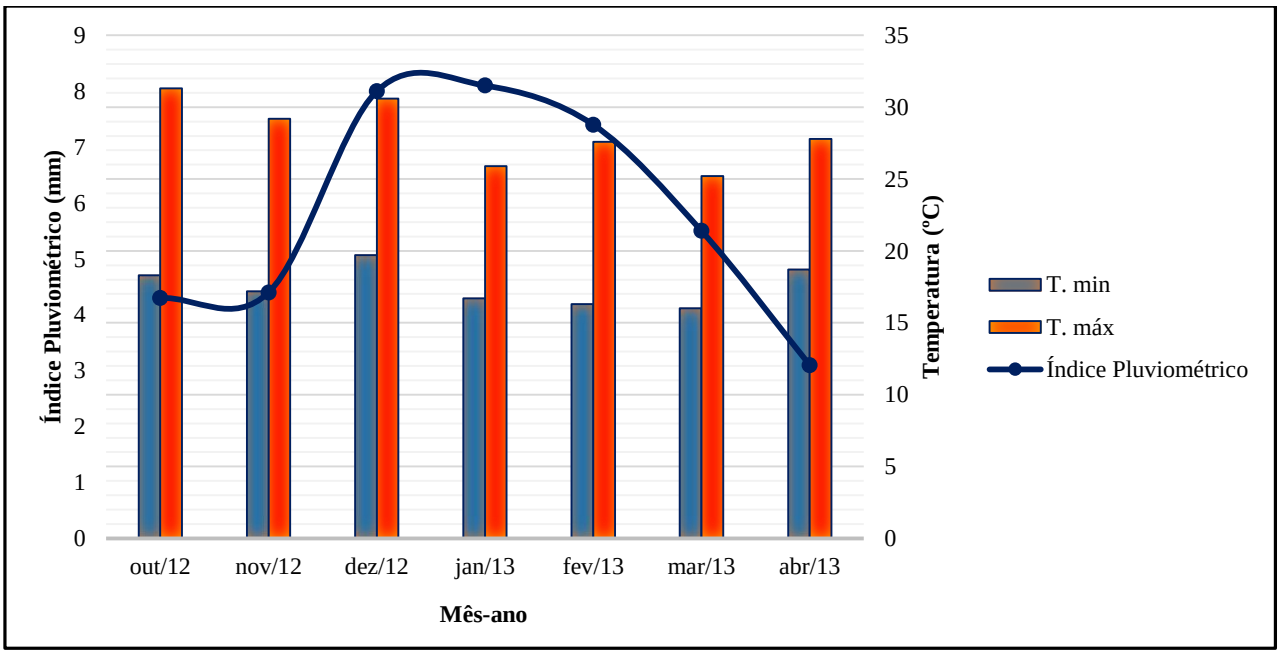
Dados referentes às temperaturas mínima e máxima (°C) e à quantidade de chuvas por metro quadrado (índice pluviométrico - mm) da região durante todo o período do experimento (outubro/2012 a março/2013) foram coletados diariamente na Estação Meteorológica automatizada próxima ao local do experimento, sob a responsabilidade do Portal Agrometeorológico e Hidrológico do Estado de São Paulo, os quais foram atentamente analisados e os resultados expressos sob a forma de média mensal.

Tabela 15 - Dados climatológicos registrados na região de Cássia dos Coqueiros (SP)

Mês-ano	T. ºC mín[1]	T. ºC máx[2]	Chuva[3]
Out/12	18,3	31,3	4,3
Nov/12	17,2	29,2	4,42
Dez/12	19,7	30,6	8,06
Jan/13	16,7	25,9	8,09
Fev/13	16,3	27,6	7,4
Mar/13	16	25,2	5,5

[1]Temperatura mínima média (ºC); [2]Temperatura máxima média (ºC); [3]Quantidade de chuvas por metro quadrado (índice pluviométrico – mm).

Gráfico 6 - Dados climatológicos [índice pluviométrico médio (mm), temperaturas máxima média (°C) e mínima média (°C)] referentes ao período de outubro/2012 a abril/2013 registrados na região de Cássia dos Coqueiros - SP.



5.12. Análise estatística

5.12.1. Variável UFC

Para o cálculo da variável UFC, foi feita a relação dos fungos isolados com as coletas, ou seja, se houve ou não significância quanto às coletas de todos os substratos (ar, solo e milho). Desta forma, a média variou entre 0,444 na 1ª coleta e 0,705 na 5ª coleta. O desvio padrão variou de 0,663 na 1ª coleta e 0,730 na 5ª coleta (Tabela 16).

Tabela 16 - Valores de média e desvio padrão da variável UFC em relação às coletas.

Coletas	Média	Desvio Padrão
1ª	0.44432273	0.66353645
2ª	0.32069887	0.50197154
3ª	0.45510785	0.77121908
4ª	0.53228639	0.59588903
5ª	0.70581189	0.73067178

Também foram feitas análises da variável UFC quanto à predominância dos fungos isolados de todas as coletas e de todos os substratos (ar, solo e milho). As médias foram de 0.021 a 2.086 e os valores de desvio padrão variaram de 0.212 a 1.107. Ainda fizemos as correlações entres os fungos isolados dos substratos (ar, solo e milho), analisando-os separadamente. Obtivemos os seguintes valores de médias: 301.7 a 0.1, para o os fungos isolados do ar. 0.061 a 0.001 para os fungos isolados do solo e, médias que variaram de 78.780 a 0.600 para os fungos isolados do milho.

5.12.2. Variável atividade de água

A variável atividade de água foi analisada quanto aos níveis detectados entre as amostras de solo e milho, ou seja, foi feita uma análise comparativa entre os níveis de atividade de água detectados nos substratos (solo e milho). A média no milho foi de aproximadamente 0.944 e a do solo de aproximadamente 0.996, os valores de desvio padrão foram de aproximadamente 0.071 e 0.001, respectivamente (Tabela 17).

Tabela 17 - Valores de média e desvio padrão da variável atividade de água em relação aos substratos.

Substrato	Média	Desvio Padrão
Milho	0.94416667	0.07199282
Solo	0.99662500	0.00118773

Esta mesma variável foi analisada também quanto aos níveis detectados durante as 3 coletas, tanto no tratamento quanto no controle, no caso do milho. E, em relação ao solo, as análises foram feitas das 5 coletas (2 realizadas antes da aplicação do produto e 3 depois da aplicação [tratamento e controle]). Os valores das médias, no milho, variaram de 0.989 a 0.874. Já os valores do desvio padrão foram de aproximadamente 0.005 a 0.103 (Tabela 18). Estes valores foram calculados em relação às coletas.

Tabela 18 - Valores de média e desvio padrão da variável atividade de água em relação aos substratos

Coletas	Média	Desvio Padrão
3ª	0.98950000	0.00494975
4ª	0.96850000	0.00919239
5ª	0.87450000	0.10394470

Os valores de média entre as parcelas do controle e tratamento foram de 0.967 e 0.920, respectivamente. Já os valores de desvio padrão foram de 0.023 nas parcelas controle e 0.103 nas parcelas de tratamento.

No solo, os valores das médias entre as coletas variaram entre 0.997 e 0.996, o desvio padrão foi de 0.002, aproximadamente (Tabela 20). Já os valores de média e desvio padrão nas parcelas de tratamento foram de 0.996 e 0.0005, respectivamente. Nas amostras controle, a média foi de 0.996 e o desvio padrão de 0.002.

Tabela 20 - Valores de média e desvio padrão da variável atividade de água em relação às coletas, no solo

Coletas	Média	Desvio Padrão
1ª	0.99700000	0.00173205
2ª	0.99700000	
3ª	0.99650000	
4ª	0.99600000	
5ª	0.99700000	

5.12.3. Variável micotoxinas (aflatoxinas e fumonisinas)

A variável micotoxinas (fumonisinas e aflatoxinas) foi avaliada quanto à detecção no decorrer das coletas, sempre comparadas ao controle negativo. Além disso, foi avaliada também quanto à atividade de água. Os valores das médias e desvio padrão das aflatoxinas e fumonisinas estão nas tabelas 21 e 22, respectivamente.

Tabela 21 - Valores de média e desvio padrão da variável "aflatoxinas" quanto às coletas (tratamento e controle) e Aa

Coletas	Tratamento		Controle		Aa	
	Média	**DP***	**Média**	**DP**	**Média**	**DP**
3ª	2.0000000	0.00000000	0.00000000	0.00000000	0.98716667	0.00444597
4ª	0.71243205	0.22316312	1.06833333	0.65758396	0.97683333	0.00688234
5ª	1.07971296	0.54171043	0.73500000	0.89092648	0.95250000	0.00662571

DP - Desvio Padrão.*

Tabela 22 - Valores de média e desvio padrão da variável "fumonisinas" quanto às coletas (tratamento e controle) e Aa

Coletas	Tratamento		Controle		Aa	
	Média	**DP**	**Média**	**DP**	**Média**	**DP**
3ª	1.03655206	0.27470120	6.750000	16.534056	0.98716667	0.00444597
4ª	0.56495951	0.45324259	587.763333	757.587147	0.97683333	0.00688234
5ª	0.89312305	0.39669904	47.521667	85.050232	0.95250000	0.00662571

6. DISCUSSÃO

Todos os grãos de cereais são expostos, no campo, a uma ampla variedade de micro-organismos provenientes da poeira, água, plantas infectadas, insetos, solo, fertilizantes e material orgânico de animais. Entretanto, o ar atmosférico parece ser a via de dispersão mais utilizada pelos fungos. O número e os tipos de micro-organismos encontrados nos grãos vão depender da resistência dos mesmos, bem como do tipo de solo, insetos, roedores e especialmente das condições climáticas durante e imediatamente após a colheita. Muitos produtos agrícolas são invadidos por fungos na pré-colheita. Em geral, amendoim, milho e semente de algodão estão entre os grãos com maior risco de contaminação (Ismail, 2000). A contaminação dos grãos por fungos toxigênicos pode ocorrer durante o cultivo, na colheita, durante o transporte, bem como durante o armazenamento (Slliker; Elliot, 1980).

A sucessão da micobiota do milho, assim como a frequência de um determinado gênero em relação a outro, é influenciada por fatores intrínsecos (relacionados diretamente ao seu substrato): umidade, pH, conteúdo nutricional, estruturas biológicas e outros. Também sujeitam-se a fatores extrínsecos (relacionados ao ambiente físico, afetando o alimento e os micro-organismos): umidade relativa do ambiente, temperatura de armazenamento, concentração de gases, presença e atividade de outros micro-organismos (Mossel et al., 1955; Asevedo et al., 1994).

Micotoxinas são compostos extremamente resistentes aos tratamentos físicos e químicos. Uma vez que contaminam os alimentos, como regra geral, permanecem neles durante o processamento e estocagem (Scott et al., 1991). As aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas, tricotecenos e zearalenona estão entre as micotoxinas de maior impacto para a saúde humana e animal, apresentando efeitos adversos em humanos e animais, os quais resultam em doenças e danos econômicos (Hussein; Brasel, 2001). De acordo com a FDA (Food and Drug Administration, EUA), devido à queda de produtividade, essas perdas econômicas chegam próximo a US$1 bilhão/ano (Bhatnagar et al., 2006). Devido a esses problemas, diversas estratégias tem sido propostas para controlar fungos micotoxigênicos diminuindo assim a concentração desses compostos nos alimentos. Esses estudos envolvem desde fungicidas a controle físico e controle biológico. Entretanto, muitas dessas estratégias apresentam efeitos limitados (Yan et al., 2004). No caso das aflatoxinas, o uso de agentes biológicos antagonistas/competidores a *Aspergillus* spp., tem se mostrado uma metodologia viável e promissora. Além disso, o controle biológico de fitopatógenos tem sido estimulado nos últimos anos principalmente pela percepção pública sobre os riscos dos agrotóxicos (Heydari; Misaghi,

1998). Produtos como o Afla-guard® foram desenvolvidos a fim de reduzir os níveis de micotoxinas, bem como diminuir as perdas associadas às subsequentes culturas contaminadas, presumivelmente através de exclusão competitiva de fungos toxigênicos (Dorner; Horn, 2007).

Em nosso trabalho, a ausência de *A. flavus* nas amostras de milho do grupo controle e o isolamento do fungo na 4ª coleta das amostras de milho tratadas coincide com os postulados de Christensen e Sauer (1982) (Tabela 9). Os autores classificam os gêneros *Aspergillus e Penicillium* como "fungos de armazenamento", porém, com habilidade de infectar os tecidos da planta em crescimento no campo, antes e durante a colheita. Em relação ao gênero *Fusarium*, o isolamento da espéci*e F. verticillioides* na totalidade das amostras de milho tratadas ratifica a teoria de Christensen e Sauer (1982) que classificam os gêneros *Fusarium, Alternaria, Cladosporium* e *Helminthosporium* como "fungos de campo". Vários autores citam as espécies de *Fusarium*, pincipalmente *F. verticillioides*, como as principais invasoras de grãos de milho no campo. (Anderson et al., 1975; Lillehoj et al., 1975; Smith; Moss, 1985; Osweiler, 1996).

Em nosso experimento, o isolamento de *F. verticillioides* tanto nas amostras do grupo controle quanto nas amostras do tratamento (Gráfico 5), vem ao encontro dos resultados de Zorzete et al. (2008), uma vez que *F. verticillioides* foi predominante em relação a *A. flavus*. Zorzete et al. (2008) que, avaliando em condições de campo as interações entre isolados toxigênicos de *A. flavus e F. verticillioides*, inoculados artificialmente em grãos de milho, observaram no grupo tratado simultaneamente com *A. flavus e F. verticillioides*, predominância de *F. verticillioides*. Tal resultado, segundo os autores, foi atribuído ao caráter endofítico de *F. verticillioides*. Nossos achados apontam uma possível competição entre *A. flavus* e *F. verticillioides*, observado na 5ª coleta (Gráfico 5), caracterizando um antagonismo passivo, no qual organismos competem por nutrientes ou por espaço, uma vez que comparado ao grupo controle, na 5ª coleta, *F. verticillioides* se demonstrou um pouco retraído, embora *A. flavus* não tenha sido isolado.

A detecção de micro-organismos em um determinado solo é função das condições ambientais intrinsecamente relacionadas. Alguns gêneros de fungos apresentam espécies representativas na maioria dos tipos de solo, como os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Maccheroni, 2004). Em nosso estudo, a micobiota do solo apresentou distribuição diferenciada, variando conforme os diferentes estágios de maturidade da planta, porém, os gêneros *Penicillium*, *Trichoderma* e *Rhizopus* destacam-se como os mais isolados (Gráfico 2). Tais achados coincidem com estudos anteriores realizados no Brasil por Zorzete et al. (2008) e

Almeida et al. (2002), analisando a micobiota do solo em regiões de plantio de milho. Já o isolamento de *A. flavus*, principal espécie produtora de aflatoxinas, foi constatado somente nas parcelas tratadas, a partir da 3ª coleta. A presença no solo de *Aspergillus* spp., principalmente *A. flavus*, torna-se relevante pela possibilidade de transferência destes fungos para o milho, resultando em danos e contaminação dos grãos com aflatoxinas.

No ar atmosférico, a maior frequência de isolamento dos gêneros *Cladosporium*, *Trichoderma e Fusarium*, considerados contaminantes universais (Gambale, 1998), também foi constatada por Gonçalez et al. (2008), analisando fungos do ar em área de plantação de amendoim. Em relação ao *A. flavus*, a presença do fungo foi constatada a partir da 3ª coleta (Gráfico 1).

Em relação às espécies de *Aspergillus*, a diferenciação morfológica (macro e microscopia) não é suficiente para distingui-los, isso ocorre devido às semelhanças interespecíficas e variabilidade intraespecífica de seus isolados (Rodrigues et al., 2009). Samson e Varga (2009) relataram que, isoladamente, nenhum método é perfeito para identificação das espécies. De acordo com os autores, a taxonomia polifásica, com o emprego de estudos morfológicos, análise de extrólitos e sequenciamento de diferentes regiões do DNA, devem ser considerados em conjunto. No presente trabalho, as espécies de *Aspergillus* isoladas foram identificadas utilizando uma abordagem polifásica. Consoante à nossa investigação, autores citam a dificuldade de, através de estudo morfológico, diferenciar as espécies *A. flavus* e *A. nomius*, pois estas compartilham muitas características comuns (Kurtzman et al., 1987). Neste caso, para diferenciá-las é necessário conhecer o perfil toxigênico, uma vez que *A. flavus* pode produzir AFB e *A. nomius* produz AFB e AFG. Outra constatação importante é o fato de isolados de *A. nomius* não produzirem ACP e, além disso, eles são diferenciados pela sequência de nucleotídeos de seus genes. Semelhanças morfológicas também são encontradas entre as espécies *A. nomius* e *A. bombycis*, que também apresentam o mesmo perfil de produção de aflatoxinas (AFB e AFG). Nesse caso, para diferenciá-las é necessário estudar a taxa de crescimento e realizar sequenciamento de diferentes regiões do DNA (Peterson et al., 2001). No quesito termorresistência, isolados de *A. bombycis* crescem moderadamente 37 °C (em média 15 mm de diâmetro), porém, não crescem a 42 °C. Por outro lado, isolados de *A. nomius* crescem vigorosamente a 37 °C (em média 65 mm de diâmetro) e também crescem a 42 °C (em média 19,8 mm de diâmetro) (Peterson et al., 2001). Tendo em vista todos esses trabalhos, os nossos resultados vem ao encontro dos achados de Peterson et al. (2001) e Kurtzman et al.

(1987), uma vez que os isolados cresceram vigorosamente a 25 e 37 ºC e não obtiveram crescimento relevante quando expostos a 42 ºC (item 5.10). Já em relação ao potencial aflatoxigênico, dos 13 isolados, 4 (2 provenientes do ar, 1 do solo e 1 do milho) foram produtores de aflatoxinas B_1 e B_2 e 9 (6 provenientes do solo, 2 do ar e 1 do milho) não foram produtores (item 5.9). Para confirmar, a sequência de nucleotídeos obtida destes isolados os identificaram como *A. flavus.*

Dando ênfase às análises micotoxicológicas, constatamos baixos níveis de aflatoxinas nos grãos de milho (Tabela 14) na amostra do tratamento e na do grupo controle (4ª coleta), porém, a menor concentração foi detectada na amostra submetida ao tratamento com o agente de biocontrole, estando portanto, bem abaixo dos níveis permitidos pela legislação brasileira que estabelece 20 µg/kg (somatória das aflatoxinas B_1+B_2+G_1+G_2) como limite máximo tolerado para aflatoxinas no milho (Brasil, 2011). Além disso, obtivemos altos níveis de atividade de água nas amostras de milho (0,95-0,99). Tais níveis podem ter sido determinantes para a não produção de aflatoxinas, uma vez que a Aa ótima para produção desta micotoxina está na faixa de 0,83 a 0,87 (Lacey et al., 1991). Estudos anteriores realizados por Atehnkeng et al. (2014), utilizando cepas não-toxigênicas de *A. flavus* para prevenir a contaminação com aflatoxinas em milho armazenado, também revelaram baixos níveis de aflatoxinas nas amostras tratadas, comparativamente com as do grupo controle.

Em relação às fumonisinas, os níveis detectados (FB_1 + FB_2) variaram de 40,2 a 574,6 µg/kg (amostras tratadas) e 209,9 a 589,42 µg/kg (grupo controle), os quais também apresentaram-se abaixo do permitido pela legislação, que é de 5000 µg/kg para milho em grão para posterior processamento (Brasil, 2011). Os resultados obtidos foram relevantes, uma vez que, comparativamente ao controle, constatou-se diminuição das concentrações da toxina principalmente nas 4ª e 5ª coletas (Tabelas 11, 12 e 13). Neste sentido, estudos desenvolvidos por alguns autores apontam níveis crescentes de fumonisinas durante o cultivo do milho, no campo (Warfield; Gilchrist, 1999). Tais dados também coincidiram com os achados de Abbas et al. (2011) em que os autores constataram diminuição dos níveis de fumonisinas em grãos de milho tratados com o agente de biocontrole Afla-guard®.

Os dados referentes aos fatores climatológicos de nossa pesquisa mostraram que, da 1ª até a 2ª coleta, o índice pluviométrico aumentou e da 3ª para a última diminuiu (Tabela 15 e Gráfico 6). Da mesma forma, os valores de Aa do milho também diminuíram desde a 3ª coleta até a última (0,986 a 0,953 nas áreas de tratamento e 0,993 a 0,948 no controle), os valores de

Aa do solo não obtiveram variações significativas (0,998 – 0,997). Já a temperatura diminuiu da 1ª para a 2ª e da 3ª para a última coleta a temperatura caiu sutilmente (Tabela 15 e Gráfico 6).

Segundo Miller (2001), *F. verticillioides* cresce bem em altas temperaturas, acima de 26 °C, de acordo com Reid et al. (1999), o acúmulo de fumonisinas pode estar associado com períodos de estresse hídrico, danos causados por insetos e o cultivo de híbridos fora de suas áreas de adaptação. De modo geral, o estresse hídrico resulta numa maior infestação por insetos herbívoros no milho, portanto não é possível separar totalmente essas variáveis. Zhang et al. (2013) acrescentaram que o crescimento de espécies de *Fusarium* produtoras de fumonisinas e a síntese destas micotoxinas no milho são influenciados por vários fatores ambientais em diferentes áreas geográficas, incluindo o clima, temperatura, umidade e precipitação pluvial, antes e durante o período de colheita, bem como por outros fatores, como infestação de insetos e práticas agrícolas inadequadas. Infecções por fungos do gênero *Fusarium* e altos níveis de contaminação por fumonisinas são geralmente favorecidos por clima quente durante o período de enchimento de grãos, chuvas durante a colheita e altas temperaturas após a colheita (Alborch et al., 2010; Fandohan et al, 2003; Zhang et al, 2013).

De acordo com Schindler et al. (1967), a temperatura ótima para crescimento de *A. flavus* está na faixa de 29 a 35 °C, bem como a Aa ótima para o seu crescimento na faixa de 0,78 a 0,80 (Beauchat, 1981).

Em nosso estudo, as variações encontradas nos dados climatológicos podem explicar o fato de *F. verticillioides* ter sido o fungo predominante no milho em relação ao *A. flavus*, uma vez que as temperaturas encontradas estavam em torno de 26 °C, a partir da 3ª coleta, mas obtiveram altos níveis na 1ª e 2ª. Além disso, os valores de Aa ótima para crescimento é de aproximadamente 0,972 (Samapundo et al., 2005), tal valor foi detectado nos grãos de milho do nosso trabalho. O baixo acúmulo de aflatoxinas detectados também podem ser explicados pelos fatores meteorológicos, tendo em vista que a temperatura ótima para a produção de aflatoxinas está na faixa de 30 °C a 35 °C (Trank, 1970), o qual não foi detectada após o plantio do milho, somente na 1ª coleta. Já os relevantes níveis de fumonisinas encontrados em nossa pesquisa está de acordo com a temperatura ótima para a produção, que varia de 20°C a 30°C (Alberts, 1990), temperatura esta encontrada em todas as coletas.

Todos estes resultados foram submetidos às análises estatísticas e não obtiveram valores significativos.

7. CONCLUSÕES

Nas condições de realização deste trabalho, e dentro dos objetivos propostos, pode-se concluir que:

- A baixa frequência de isolamento de *A. flavus* no milho deveu-se ao fato do mesmo ser considerado fungo de armazenamento. Por sua vez, a presença de *F. verticillioides* nas amostras controle e tratadas, principalmente na 5ª coleta, pode ser atribuído ao fato deste ser considerado fungo de campo e endofítico.

- A baixa freqüência de isolamento de *F. verticillioides* nas amostras de milho do grupo tratado, comparativamente ao grupo controle, demonstra interferência do produto no crescimento do fungo.
- A maioria dos isolados de *A. flavus*, provavelmente, foram oriundos do agente de biocontrole, uma vez que não foram potencialmente produtores de aflatoxinas.

- Os níveis de Aa encontrados não contribuíram para a alta produção de aflatoxinas, entretanto, foram determinantes na produção de fumonisinas.

- Embora os níveis de aflatoxinas detectados terem sido baixos, comparativamente ao grupo controle, a área tratada apresentou menor nível.

- As fumonisinas detectadas, no grupo controle, apresentaram maiores níveis em relação às áreas tratadas.

- As temperaturas encontradas na região do plantio não contribuíram para a produção de aflatoxinas, porém, foram determinantes para a produção de fumonisinas.

- A baixa frequência de isolamento de *A. flavus* no milho dificultou uma melhor avaliação da eficácia do produto.

- Embora não tenha apresentado resultados estatisticamente significativos, o emprego do agente de biocontrole foi relevante no que diz respeito a diminuição da contaminação por *F. verticillioides* e fumonisinas. Entretanto, outros estudos são necessários para uma melhor avaliação do produto.

8. ANEXOS

ANEXO A.

A.1. Micobiota do ar

1ª coleta

Parcela 1: *Trichoderma* spp. (420,5 UFC/m^3), *Epicoccum* spp. (36,75 UFC/m^3), *Fusarium solani* (29,75 UFC/m^3), *Neorospora* spp. (25,75 UFC/m^3), *Mucor* spp. (4 UFC/m^3).

Parcela 4: *Trichoderma* spp. (206,5 UFC/m^3), *Cladosporium* spp. (43 UFC/m^3), *A. niger* (30,25 UFC/m^3), *Neorospora* spp. (19,25 UFC/m^3), *Fusarium solani* (6,5 UFC/m^3), *Rhizopus* spp. (1 UFC/m^3), *Eurotium* spp. (0,25 UFC/m^3).

Parcela 5: *Trichoderma* spp. (137,5 UFC/m^3), *Acremonium* spp. (19,5 UFC/m^3), *Mucor* spp. (15,75 UFC/m^3), *Epicoccum* spp. (9,5 UFC/m^3), *Rhizopus* spp. (1 UFC/m^3), *A. niger* (0,25 UFC/m^3).

Parcela 7: *Trichoderma* spp. (250,25 UFC/m^3), *Neorospora* spp. (23,5 UFC/m^3), *F. solani* (21,25 UFC/m^3), *Rhizopus* spp. (20,5 UFC/m^3), *Epicoccum* spp. (9,25 UFC/m^3), *Penicillium* spp. (0,75 UFC/m^3).

Parcela 10: *Cladosporium* spp. (44,25 UFC/m^3), *Trichoderma* spp. (10,5 UFC/m^3), *Epicoccum* spp. (10,25 UFC/m^3), *Phoma* spp. (1,75 UFC/m^3), *F. graminearum* (0,75 UFC/m^3), *Penicillium* spp. (0,75 UFC/m^3), *Rhizopus* spp. (0,75 UFC/m^3).

2ª coleta

Parcela 2: *Cladosporium* spp. (102,5 UFC/m^3), *Epicoccum* spp. (20,25 UFC/m^3), *Acremonium* spp. (3 UFC/m^3).

Parcela 3: *Cladosporium* spp. (62,75 UFC/m^3), *Epicoccum* spp. (4,5 UFC/m^3), *GFSC** (3 UFC/m^3), *Mucor* spp. (0,25 UFC/m^3).

Parcela 6: *Cladosporium* spp. (45,5 UFC/m^3), *Epicoccum* spp. (25 UFC/m^3), *Phoma* spp. (4 UFC/m^3), *Acremonium* spp. (2,25 UFC/m^3).

Parcela 8: *Cladosporium* spp. (63,5 UFC/m^3), *Epicoccum* spp. (8,25 UFC/m^3), *Nigrospora* spp. (7 UFC/m^3), *GFSC** (2,75 UFC/m^3).

Parcela 9: *Cladosporium* spp. (20,5 UFC/m^3), *GFSC** (11 UFC/m^3), *Epicoccum* spp. (4 UFC/m^3), *F. solani* (2,75 UFC/m^3).

* *GFSC: Giberella fugikuroi* Species Complex

3ª coleta

Parcela 2: *Cladosporium* spp. (258,75 UFC/m^3), *Trichoderma* spp. (3,75 UFC/m^3), *Mucor* spp. (0,5 UFC/m^3).

Parcela 3: *Cladosporium* spp. (380,75 UFC/m^3), *Trichoderma* spp. (53 UFC/m^3).

Parcela 5: *Cladosporium* spp. (195,75 UFC/m^3), *Mucor* spp. (0,5 UFC/m^3), *GFSC** (0,25 UFC/m^3).

Parcela 7: *Phoma* spp. (156 UFC/m^3), *Cladosporium* spp. (80,25 UFC/m^3), *Pestalotiopsis* spp. (0,5 UFC/m^3), *Mucor* spp. (0,5 UFC/m^3).

Parcela 9: *Cladosporium* spp. (300,25 UFC/m^3), *A. flavus* (0,25 UFC/m^3), *Phoma* spp. (0,25 UFC/m^3).

Parcela Controle: *Cladosporium* spp. (787 UFC/m^3), *Epicoccum* spp. (48,25 UFC/m^3).

* *GFSC: Giberella fugikuroi* Species Complex

4ª coleta

Parcela 1: *F. solani* (295 UFC/m^3), *Cladosporium* spp. (104,5 UFC/m^3), *F. graminearum* (8,75 UFC/m^3), *Acremonium* spp. (8,25 UFC/m^3), *Epicoccum* spp. (4 UFC/m^3), *A. flavus* (2,75 UFC/m^3).

Parcela 4: *Cladosporium* spp. (82,25 UFC/m^3), *Pestalotiopsis* spp. (38 UFC/m^3), *F. solani* (24 UFC/m^3), *F. graminearum* (9,25 UFC/m^3), *Epicoccum* spp. (8,75 UFC/m^3).

Parcela 6: *Pestalotiopsis* spp. (163,75 UFC/m^3), *F. solani* (11,75 UFC/m^3), *Nigrospora* spp. (3 UFC/m^3), *Epicoccum* spp. (2 UFC/m^3), *F. graminearum* (1,5 UFC/m^3), *Penicillium* spp. (0,5 UFC/m^3), *Alternaria* spp. (0,25 UFC/m^3).

Parcela 8: *Epicoccum* spp. (112 UFC/m^3), *F. graminearum* (3,75 UFC/m^3), *Mucor* spp. (3,5 UFC/m^3), *Cladosporium* spp. (2,75 UFC/m^3).

Parcela 10: *Nigrospora* spp. (29,5 UFC/m^3), *Pestalotiopsis* spp. (29,25 UFC/m^3), *F. graminearum* (6,75 UFC/m^3), *Cladosporium* spp. (0,75 UFC/m^3).

Parcela Controle: *Alternaria* spp. (38,5 UFC/m^3), *Nigrospora* spp. (35,75 UFC/m^3), *Cladosporium* spp. (23 UFC/m^3), *F. graminearum* (14,25 UFC/m^3), *Epicoccum* spp. (4 UFC/m^3), *A. flavus* (0,5 UFC/m^3), *Rhizopus* (0,25 UFC/m^3).

5ª coleta

Parcela 2: *Epicoccum* spp. (189,25 UFC/m^3), *Cladosporium* spp. (126,5 UFC/m^3), *Alternaria* spp. (14,25 UFC/m^3), *Phoma* spp. (2,75 UFC/m^3), *F. solani* (0,5 UFC/m^3).

Parcela 3: *Cladosporium* spp. (70,5 UFC/m^3), *Alternaria* spp. (55,75 UFC/m^3), *Epicoccum* spp. (6,75 UFC/m^3), *Phoma* spp. (3,25 UFC/m^3).

Parcela 5: *Cladosporium* spp. (87,5 UFC/m^3), *F. solani* (38,75 UFC/m^3), *Phoma* spp. (10,25 UFC/m^3), *Alternaria* spp. (6 UFC/m^3).

Parcela 7: *Eurotium* spp. (82,75 UFC/m^3), *Cladosporium* spp. (82,5 UFC/m^3), *Epicoccum* spp. (21,5 UFC/m^3).

Parcela 9: *Cladosporium* spp. (77,5 UFC/m^3), *F. andyiazi* (58 UFC/m^3), *Cochliobolus* spp. (47,75 UFC/m^3), *Epicoccum* spp. (8 UFC/m^3).

Parcela Controle: *Cladosporium* spp. (95 UFC/m^3), *F. solani* (67,5 UFC/m^3), *F. verticillioides* (18 UFC/m^3), *Epicoccum* spp. (4 UFC/m^3).

ANEXO A.2. Micobiota do solo

1ª coleta

Parcela 1: *Penicillium* spp. (53 UFC/g x 10^3), *Cladosporium* spp. (39 UFC/g x 10^3), *GFSC** (10 UFC/g x 10^3), *Nigrospora* spp. (10 UFC/g x 10^3), *Eurotium* spp. (3 UFC/g x 10^3).

Parcela 4: *F. solani* (40 UFC/g x 10^3), *Trichoderma* spp. (27 UFC/g x 10$^{3)}$), *Penicillium* spp. (20 UFC/g x 10$^{3)}$), *Phoma* spp. (10 UFC/g x 10$^{3)}$), *F. verticillioides* (10 UFC/g x 10^3), *Mucor* spp. (1 UFC/g x 10^3).

Parcela 5: *Penicillium* spp. (55 UFC/g x 10^3), *Gongronella* spp. (30 UFC/g x 10^3), *Epicoccum* spp. (13 UFC/g x 10^3), *F. graminearum* (10 UFC/g x 10^3), *Trichoderma* spp. (6 UFC/g x 10^3).

Parcela 7: *Penicillium* spp. (140 UFC/g x 10^3), *Rhizopus* spp. (11 UFC/g x 10^3), *Alternaria* spp. (10 UFC/g x 10^3), *Eurotium* spp. (10 UFC/g x 10^3), *Trichoderma* spp. (3 UFC/g x 10^3), *Cladosporium* spp. (3 UFC/g x 10^3), *Phoma* spp. (2 UFC/g x 10^3).

Parcela 10: *Penicillium* spp. (63 UFC/g x 10^3), *Mucor* spp. (10 UFC/g x 10^3), *Rhizopus* spp. (1 UFC/g x 10^3).

2ª coleta

Parcela 2: *Penicillium* spp. (10 UFC/g x 10^3), *Myrothecium* spp. (2 UFC/g x 10^3), *Rhizopus* spp. (1 UFC/g x 10^3).

Parcela 3: *Rhizopus* spp. (3 UFC/g x 10^3), *Penicillium* spp. (0,3 UFC/g x 10^3), *Myrothecium* spp. (0,1 UFC/g x 10^3).

Parcela 6: *GFSC** (3 UFC/g x 10^3), *Rhizopus* spp. (1 UFC/g x 10^3).

Parcela 8: *Trichoderma* spp. (10 UFC/g x 10^3), *Penicillium* spp. (1 UFC/g x 10^3), *Rhizopus* spp. (1 UFC/g x 10^3).

Parcela 9: *F. verticillioides* (12 UFC/g x 10^3), *F. incarnatum* (1 UFC/g x 10^3), *Penicillium* spp. (1 UFC/g x 10^3), *Rhizopus* spp. (1 UFC/g x 10^3).

3ª coleta

Parcela 2: *Penicillium* spp. (3 UFC/g x 10^3), *F. verticillioides* (2 UFC/g x 10^3), *Epicoccum* spp. (1 UFC/g x 10^3), *Trichoderma* spp. (1 UFC/g x 10^3), *Rhizopus* spp. (1 UFC/g x 10^3).

Parcela 3: *Penicillium* spp. (11 UFC/g x 10^3), *Clonostachys* spp. (4 UFC/g x 10^3), *F. graminearum* (1 UFC/g x 10^3).

Parcela 5: *Epicoccum* spp. (5 UFC/g x 10^3), *F. graminearum* (1 UFC/g x 10^3), *F. solani* (1 UFC/g x 10^3), *A. flavus* (1 UFC/g x 10^3), *Exophiala* spp. (1 UFC/g x 10^3).

Parcela 7: *Epicoccum* spp. (8 UFC/g x 10^3), *Penicillium* spp. (5 UFC/g x 10^3), *A. flavus* (1 UFC/g x 10^3), *Epicoccum* spp. (1 UFC/g x 10^3).

Parcela 9: *Penicillium* spp. (7 UFC/g x 10^3), *F. verticillioides* (3 UFC/g x 10^3), *Epicoccum* spp. (2 UFC/g x 10^3), *Nigrospora* spp. (1 UFC/g x 10^3).

Parcela controle: *Rhizopus* spp. (1 UFC/g x 10^3).

4ª coleta

Parcela 1: *Penicillium* spp. (19 UFC/g x 10^3), *Trichoderma* spp. (2 UFC/g x 10^3), *Mortierella* spp. (2 UFC/g x 10^3), *F. verticillioides* (1 UFC/g x 10^3).

Parcela 4: *Penicillium* spp. (12 UFC/g x 10^3), *Cladosporium* spp. (10 UFC/g x 10^3), *A. flavus* (2 UFC/g x 10^3), *F. verticillioides* (1 UFC/g x 10^3), *F. oxysporum* (1 UFC/g x 10^3), *Phoma* spp. (1 UFC/g x 10^3).

Parcela 6: *Penicillium* spp. (17 UFC/g x 10^3), *A. flavus* (5 UFC/g x 10^3), *Trichoderma* spp. (1 UFC/g x 10^3).

Parcela 8: *Penicillium* spp. (6 UFC/g x 10^3), *Epicoccum* spp. (5 UFC/g x 10^3), *A. flavus* (1 UFC/g x 10^3), *Mucor* spp. (1 UFC/g x 10^3), *Mortierella* spp. (1 UFC/g x 10^3).

Parcela 10: *F. oxysporum* (6 UFC/g x 10^3), *Trichoderma* spp. (1 UFC/g x 10^3), *Penicillium* spp. (1 UFC/g x 10^3).

Parcela controle: *Trichoderma* spp. (5 UFC/g x 10^3), *Penicillium* spp. (2 UFC/g x 10^3), *Rhizopus* spp. (2 UFC/g x 10^3).

5ª coleta

Parcela 2: *Trichoderma* spp. (1 UFC/g x 10^4), *F. verticillioides* (1 UFC/g x 10^4), *Cladosporium* spp. (1 UFC/g x 10^4).

Parcela 3: *Eurotium* spp. (14 UFC/g x 10^3), *Penicillium* spp. (3 UFC/g x 10^3), *Mucor* spp. (2 UFC/g x 10^3), *Trichoderma* spp. (1 UFC/g x 10^3).

Parcela 5: *Eurotium* spp. (12 UFC/g x 10^3), *Cladosporium* spp. (2 UFC/g x 10^3), *Rhizopus* spp. (1 UFC/g x 10^3), *F. verticillioides* (1 UFC/g x 10^3), *F. oxysporum* spp. (1 UFC/g x 10^3), *Mortierella* spp. (1 UFC/g x 10^3).

Parcela 7: *Penicillium* spp. (7 UFC/g x 10^3), *Mucor* spp. (4 UFC/g x 10^3), *A. flavus* (2 UFC/g x 10^3), *Trichoderma* spp. (1 UFC/g x 10^3).

Parcela 9: *Fusarium solani* (7 UFC/g x 10^3), *F. verticillioides* (2 UFC/g x 10^3), *Penicillium* spp. (2 UFC/g x 10^3), *Eurotium* spp. (2 UFC/g x 10^3), *A. flavus* (1 UFC/g x 10^3), *Trichoderma* spp. (1 UFC/g x 10^3), *F. graminearum* (1 UFC/g x 10^3).

Parcela controle: *Penicillium* spp. (4 UFC/g x 10^3), *Trichoderma* spp. (4 UFC/g x 10^3), *Rhizopus* spp. (3 UFC/g x 10^3), *F. solani* (1 UFC/g x 10^3).

9. REFERÊNCIAS

Abbas H, Horn B., Weaver M, Jin X, Abel C. SHIER, W. T. *Reduction of aflatoxins, cyclopiazonic acid and fumonisins in corn by biocontrol strains of non-aflatoxigenic Aspergillus flavus.* In: APS IPPC Joint Meeting, Honolulu, Hawaii: Hawaii Convention Center 2011, Anais, p. 101.

Abbas HK, Weaver MA, Horn BW, Carbone I, Monacell JT, Shier WT. Selection of *Aspergillus flavus* isolates for biological control of aflatoxins in corn. *Toxin Reviews*. 2011; 30(2-3):59-70.

Abdollahi A, Buchanan RL. Regulation of aflatoxin biosynthesis: induction of aflatoxin production by various carbohydrates. *J. Food Sci.*, v. 46, p. 633-635, 1981.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC n° 7 de 18 de fevereiro de 2011, publicada em 22 de fevereiro de 2011, republicada em 9 de março de 2011.

Ainsworth GC. *Introduction to the history of mycology*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1976.

Alberts JF, Gelderblom WCA, Thiel PG, Marasas WFO, Van Schalkwyk DJ, Vehrend Y. Effects of temperature and incubation period on the production of fumonisin B_1 by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990; 56:1729–33.

Alborch L, Bragulat MR, Cabañes FJ. Comparison of two selective culture media for the detection of *Fusarium* infection in conventional and transgenic maize kernels. *Lett. Appl. Microbiol.* 2010; 50: 270-5.

Allcroft R, Rogers H, Lewis G, Nabney J, Best PE. Metabolism of aflatoxin in sheep: excretion of the milk toxin. *Nature*. 1966; 209:154-5.

Almeida AP, Fonseca H, Fancelli AL, Direito GM, Ortega EM, Corrêa AB. Mycoflora and fumonisin contamination in Brasilian corn from sowing to harvest. *J Agric Food Chem*. 2002; 50:3877-82.

Anderson HW, Nehring EW, Wicher WR. Aflatoxin contamination of corn in the field. *J Agric Food Chem*. 1975; 23:775-82.

Angle JS, Dunn KA, Wagner GH. Effect of cultural practices on the soil population of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 1982; 46:301-4.

Applebaum RS, Brackett RE, Wiseman DW, Marth EH. Responses of dairy cows to dietary aflatoxin: feed intake and yield, toxin content, and quality of milk of cows treated with pure and impure aflatoxin. *J. Dairy Sci*. 1982; 65:1503-8.

Asevedo IG, Gambale W, Corrêa B, Paula CR, Souza VM, Almeida RMAD. Mycoflora and aflatoxigenic species of *Aspergillus* spp. isolated from stored maize. *Rev Microbiol*. 1994; 25:46-50.

Atehnkeng J, Ojiambo PS, Cotty PJ, Bandyopadhyay R. Field efficacy of a mixture of atoxigenic *Aspergillus flavus* Link: Fr vegetative compatibility groups in preventing aflatoxin contamination in maize (*Zea mays* L.). *Biological Control*. 2014; 72:62-70.

Beauchat LR. Microbial stability as affected by water activity. *Cereal Food World*. 1981; 26: 345-9.

Bedard LL, Massey TE. Aflatoxin B_1-induced DNA damage and its repair. *Cancer Letters*. 2006; 241:174-83.

Berjak P. Report of seed storage committee working group on the effects of storage fungi on seed viability. *Seed Sci. & Technol*. 1984; 12:233-53.

Bettiol W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol W, editores. *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna: EMBRAPA CNPMA; 1991. p. 1-5.

Bettiol W. Conversão de sistemas de produção. In: Poltronieri LS, Ishida AKN, editors. *Métodos alternativos de controle de insetos-praga, doenças e plantas daninhas: Panorama atual e perspectivas*. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental; 2008. p. 289-308.

Bettiol W, Ghini R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: Campanhola C, Bettiol W, editores. *Métodos alternativos de controle fitossanitário*. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente; 2003. p. 79-95.

Bettiol W, Morandi MAB. *Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas*. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente; 2009. p. 73-9.

Bhatnagar D, Carly JW, Ehrlich KC, Yu J, Cleveland TE. Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia*. 2006; 125:155 – 66.

Bhatnagar D, Yu J, Ehrlich KC. Toxins of filamentous fungi. *Chem. Immunol*. 2002;81:167–206.

Biosphere Indústria e Comércio de Insumos Agrícolas Ltda: Afla-guard®. Cravinhos: Biosphere; 2013. [citado em 26 fev 2014]. Disponível em: http://biosphere.agr.br/afla-guard/.

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC no 7 da Anvisa, 22 de fevereiro de 2011. Estabelece limites de tolerância para micotoxinas em alimentos, Diário Oficial da União Seção 1 (n. 37), Brasília, 22 de fevereiro de 2011.

Bullerman LB. Significance of mycotoxins to food safety and human health. *J. Food Prot.* 1979; 42: 65-86.

Bu'lock JD. Mycotoxins as secondary metabolities. In: Steyn PS, editors. *The biosynthesis of mycotoxins*. New York: Academy Press; 1980. p. 1-16.

Busby WF, Wogan GN. Aflatoxins. In: Searle CE, editors. *Chemical carcinogens*. Washington: American Chemical Society; 1984. p. 945-1136.

Cahagnier B, Melcion D, Richard-Molard D. Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B_1 on maize grain as a function of different water activities. *Lett. Appl. Microbiol.* 1995; 20: 247-51.

Carbone I, Kohn LM. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia.* 1999; 91: 553–6.

Carlile MJ, Watkinson S. *The Fungi*. San Diego, CA: Academic Press Ltd; 1994.

Christensen CM, Sauer DB. Mycoflora: In: Christensen CM e Christensen CM, editors. *Storage of cereal grains and their products*. Minessota: American Association of Cereal Chemists; 1982. p. 219-40.

Ciegler A. Fungi that produce mycotoxins: condition and occurrence. *Mycopathologia. 1978;* 65: 5-11.

Clevström G. *Studies of fungi flora of plants and feeds: the influence of formic acid on growth and aflatoxin production in Aspegillus flavus*. Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Microbiology; 1986. p. 11-46.

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2011/2012 – 8º levantamento. 2012. [citado em 16 abr 2014] Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/conab/levantamento.pdf.>.

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2013/2014 – 4º levantamento. 2014. [citado em 16 abr 2014] Disponível em:<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&&Pagina_objcmsconteudos=1#A_objcmsconteudos>

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Estudos de prospecção de mercado- Safra 2011/2012. 2011. [citado em 16 abr 2014]. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/_11_09_22_14_05_58_prospeccao_safra_2011-2012..pdf>.

Cotty PJ, Bayman P, Egel DS, Elis KS. Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*. In: Powell K A, Renwick A, Peberdy JF, editors. *The Genus Aspergillus: From Taxonomy and Genetics to Industrial Applications*. New York: Plenum Press; 1994. p. 1-27.

Cotty PJ, Bhatnagar D. Variability among atoxigenic *Aspergillus flavus* strains in ability to prevent aflatoxin contamination and production of aflatoxin biosynthetic pathway enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994; 60: 2248-51.

Council for Agricultural Science and Technology (CAST) - *Mycotoxins: Risks in Plants, Animal, and Human Systems*. Ames (IA): Task Force Report; 2003.

Covarelli L, Stifano S, Beccari G, Raggi L, Lattanzio VMT, Albertini E. Characterization of *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Italy: Fumonisin production, pathogenicity and genetic variability. *Food Microbiol*. 2012; 31: 17-24.

De Iongh H, Vles RO, Van Pelt JG. Milk of mammals fed on aflatoxin- containing diet. *Nature*. 1964; 202: 466-7.

Deacon JW. *Introduction to modern mycology*. London: Blackwell Sci. Publi.; 1980. p.197.

Deacon JW. *Introduction to modern mycology*. 2ed. London: Blackwell Sci. Publ.; 1984. p. 238.

Degola F, Berni E, Dall'asta C, Spotti E, Marchelli R, Ferrero I, Restivo FM. A multiplex RT-PCR approach to detect aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *J. Appl. Microbiol*. 2007; 103: 409-41.

Delp RB, Stwell LJ, Marois JJ. Evaluation of field sampling techniques for estimation of disease incidence. *Phytopathology*. 1986; 76: 1299-305.

Desjardins AE, Plattner RD, Proctor RH. Genetic and biochemical aspects of fumonisin production. In: Jackson LS et al, editors. *Fumonisins in food*. New York: Springer Science. 1996. p. 165-73.

Diener UL, Davis ND. *Aflatoxin formation in peanuts by Aspergillus flavus*. Alburn (AL): Agricultural Experiment Station; 1977.

Dilkin P, Mallman CA, Almeida CAA, Corrêa B. Robotic automated clean-up for detection of fumonisins B_1 and B_2 in corn and corn-based feed by high-performance liquid chromatography. *J. Chrom. A.* 2001; 965:151-7.

Ditchfield C. *Estudo dos métodos para a medida da atividade de água* [dissertação]. São Paulo: Escola Politécnica, Universidade de São Paulo; 2000.

Dorner JW. Biological control of aflatoxin contamination of crops. In: Abbas HK, editors. *Aflatoxin and food safety*. Boca Raton: CRC Press. 2005. p. 333-52.

Dorner JW. Development of biocontrol technology to manage aflatoxin contamination in peanuts. *Peanut Science*. 2009; 36: 60-67.

Dorner JW, Cole RJ. Effect of application of nontoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on subsequent aflatoxin contamination of peanuts in storage. *J. Stored Prod. Res*. 2002; 38: 329–39.

Dorner JW, Horn B. Separate and combined applications of nontoxigenic *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* for biocontrol of aflatoxin in peanuts. *Mycopathologia*. 2007; 163: 215-23.

Dorner JW, Cole RJ, Connick WJ, Daigle DJ, McGuire MR, Shasha BS. Evaluation of biological control formulations to reduce aflatoxins contamination in peanuts. *Biological Control*. 2003; 26: 318-24.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Zoneamento agrícola – Época de plantio de milho [on-line]; 2009 [citado em 17 ago 2015]. Disponível em: <http://www.cnps.embrapa.br/publicacoes/milho/zoneamento.htm.>

EU. 2006. Commission Regulation (EC) 1881/2006 of Decembre 19th 2006 replacing Regulation (EC) 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Publications of the European Communities*. 2006; L364: 5–24.

EU. 2010. Commission Regulation (EU) No 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Official Publications of the European Communities*. 2010; L50: 8–12.

Fancelli AL. Tecnologia da Produção. In: Fancelli AL. et al., editors. *Milho: produção, pré-processamento e transformação agroindustrial*. São Paulo: Secretaria da Agricultura e Comércio, Ciência e Tecnologia. 1983. p. 1-68.

Frederiksen RA, Odvody GN. *Compendium of sorghum diseases*. St. Paul (MN): APS Press. 2000. p. 1-41.

Fandohan P, Hell K, Marasas WFO, Wingfield MJ. Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in Africa. *Afr. J. Biotechnol.* 2003; 2: 570-9.

Frisvad JC, Samson RA. Filamentous fungi in Foods and Feeds: Ecology, spoilage and mycotoxins production. In: Dilip K et al., editors. *Handbook of Applied Mycology: Foods and Feeds*. New York: Marcel Dekker. 1991. p. 31-68.

Frisvad JC, Skouboe P, Samson RA. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B_1, sterigmatocystin and 3-o-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol*. 2005;28: 442–53.

Futuyma DJ. *Biologia evolutiva*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 1997. p. 232-324.

Gambale W. Fungos contaminantes. In: Zaitz, C. et al, editores. *Compêndio de Micologia Média*. São Paulo: MEDSI. 1998, p. 113-21.

Gardener BBM, Fravel DR. Biological control of plants pathogens: research, commercialization and application in USA. Plant Health Progress. 2002.

Geiser DM, Jimenez-Gasco MM, Kang S, Makalowska I, Veeraraghavan N, Ward TJ, Zhang N, Kuldau GA, O'donnell K. Fusarium-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur. J. Plant Pathol*. 2004; 110: 473-79.

Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samson RA. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Study Mycology*. 2007; 59: 1-10.

Gelderblom WC, Jaskiewicz K, Marasas WFO, Thiel PG, Horak RM, Vleggaar R, Kriek NP. Fumonisins – novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol*. 1988; 54: 806-11.

Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol*. 1995; 61: 1323–30.

Globo Rural. Milho sai da sombra da soja na safra 2011/2012. **Mil e uma utilidades Derivados de alto valor atendem a indústrias em diversos ramos de atuação [on-line]; 2012 [citado em 17 ago 2015]. Disponível em:** <http://revistagloborural.globo.com/Revista/Common/0,,ERT262560-18283,00.html.>

Goldblatt LA. Implications of mycotoxins. *Clin. Toxicol*. 1972; 5: 453-8.

Gonçalez E, Nogueira JHC, Fonseca H, Felicio JD, Pino FA, Corrêa B. Mycobiota and mycotoxins in Brazilian peanuts kernels from sowing to harvest. *International Journal of Food Microbiology*. 2008; 123: 184-90.

González HHL, Resnik SL, Pacin AM. Mycoflora of freshly harvested flint corn from Northwestern Provinces in Argentina. *Mycopathologia*. 2003; 155: 207-11.

Hawksworth DL. Naming *Aspergillus* species: progress towards one name for each species. *Med. Mycol.* 2011; 49: 70–6.

Heydari A, Misaghi IJ. Biocontrol activity of *Burkholderia cepacia* against *Rhizoctonia solani* in herbicide-treated soils. *Plant and Soil*. 1988; 202: 109-16.

Horn BW, Dorner JW, Greene RL, Blankenship PD; Cole R J. Effect of *Aspergillus parasiticus* soil inocculum on invasion of peanut seeds. *Mycopathologia.* 1994; 125: 179-91.

Hua SST, Baker JL, Flores-Espiritu M. Interactions of saprophytic yeasts with a nor mutant of *Aspergillus nidulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65: 2738-40.

Hurst CJ. *Manual of Environmental Microbiology*. Washington (DC): American Society for Microbiology, 1996.

Hussein HS, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. 2001; 167: 101-34.

International Agency for Research on Cancer (IARC). *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*. Geneve: IARC (Ed); 1993.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2014 [citado em 18 ago 2015]. Disponível em: http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=351090&search=sao-paulo|cassia-dos-coqueiros.

Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO). *Normalização e qualidade industrial: orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*: Revisão: 01. 2003. p. 35.

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Currie, LA editor. Commission on Analytical Nomenclature, Recommendations in Evaluation of Analytical Methods including Detection and Quantification Capabilities, Pure Appl. Chem. *Analytica Chimica Acta*. 1999; 67: 1699-723.

Ismail MA. Deterioration and spoilage of peanuts and deciccated coconuts from two sub-saharan tropical East African countries due to the associated mycobiota and their degradative enzymes. *Mycopathologia*. 2000; 150: 67-80.

Jay JM. *Microbiologia Moderna de Los Alimentos*. 3a ed. Zaragoza: Editorial Acribia; 1994. P. 753.

Kpodo K, Thrane U, Hald B. *Fusarium* and fumonisins in maize from Ghana and their co-occurrence with aflatoxins. *Int. J. Food Microbiol*. 2000; 61: 147-57.

Kurtzman CP, Horn CP, Hesseltine CW. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *A. Van Leeuw*. 1987; 53: 147-58.

Lacey J. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl*. 1989; 1S-25S.

Lacey J, Magan N. Fungi in cereal grain: their occurrence and water activity and temperature relations. In: Chelkowski J, editor. *Cereal grain: mycotoxins, fungi and quality in drying and storage.* Amsterdam: Elsevier Science. 1991. p. 77 – 118.

Leitão MF. Microbiologia de Alimentos. In: Roitman I, Travassos LR, Azevedo JL, editores. *Tratado de Microbiologia*. São Paulo: Manole. 1988. p. 1-81.

Leslie JF. Introductory biology of *Fusarium moniliforme*. In: Jackson LS, De Vries JW, Bullerman LB, editors. *Fumonisins in food.* New York: Plenum Press. 1996. p. 153-64.

Leslie JF, Klein KK. Female fertility and mating type effects on effective population size and evolution in filamentous fungi. *Genetics*. 1996; 144: 557-67.

Leslie JF, Zeller KA, Summerell BA. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. *Physiol. Mol. Plant Path.* 2001; 59: 107-17.

Leslie JF, Summerell BA. *The Fusarium laboratory manual*. Iowa: Blackwell Publishing. 2006. p. 388.

Lillehoj EB, McMillian WW, Guthrie WD, Barry D. Aflatoxin- producing fungi in pre-harvest corn: inoculum source in insects and soils. *J. Environ. Qual.* 1980; 9: 691-4.

Lillehoj EB, Kwolek WF, Guthrie WD, Barry D. Aflatoxin accumulation in pre-harvest maize kernels: Interaction of three fungal species, european corn borer and two hybrids. *Plant and Soil*. 1982; 65: 95-102.

Lillehoj EB, Kwolek WF, Vandegraft EE, Zuber MS, Calvert OH, Widstrom NW et al. Aflatoxin production in *Aspergillus flavus* inoculated ears of corn grown at diverse locations. *Crop Sci*. 1975; 15: 267-70.

Lin MT, Dianese JC. A Coconut-Agar Medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. *Phytopathol.* 1976; 66:1466-9.

Link HF. Observationes in Ordines plantarum naturales. Dissertatio prima, complectens Anandrarum ordines Epiphytas, Mucedines Gastomycos et Fungos Der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin. *Magazin für die neuesten Entdeckungen in der gesamten Naturkunde*. 1809; 3: 1–42.

Lino CM, Silva LJG, Pena AS. Fumonisinas: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. *Rev. Port. Cien. Vet***.** 2004; 99: 181-92.

Kokalis-Burelle N, Porter DM, Rodríguez-Kábana R, Smith DH, Subrahmanyam P. *Compendium of peanut diseases*. 2nd ed. St. Paul: The American Phytopathological Society. 1997. p. 94.

Maccheroni Jr. W, Araújo WL, Lima AOS. Ecologia: Habitat e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias. In Azevedo JL, Esposito E. *Fungos: Uma introdução a Biologia, Bioquimica e Biotecnologia*. Caxias do Sul: EDUCS. 2004. p. 451- 90.

Machado AT, Magnavaca R. *Estresse ambiental: O milho em perspective*. Rio de Janeiro: AS-PTA, Cadernos de T.A. 1991. p. 1-3.

Marasas WF. Fumonisins: History, World - wide occurrence and impact. *Fumonisins in food*. 1996; 392: 1-17.

Marasas WF. Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. *Environ Health Perspect*. 2001; 109: 239-43.

Marín S, Magan N, Ramos AJ, Sanchis V. Fumonisin producing strains of *Fusarium*: a review of their ecophysiology. *J. Food Prot*. 2004; 67: 1792-805.

Marín S, Sanchis V, Arnau F. Colonisation and competitiveness of *Aspergillus* and *Penicillium* species on maize grain in the presence of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *Int. J. Food Microbiol*. 1998; 45: 107–17.

Martin JP. Use of acid rose Bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci*. 1950; 89: 215-32.

Micheli P.A. Nova Plantarum General Juxta Tournefortii Methodum Disposita. *Typis Bernardi Paperinii*. Florence (ITA). 1729.

Miller JD. Epidemiology of *Fusarium* ear diseases of cereals. In: Miller JD et al., editors. *Mycotoxins in grain*. St. Paul: Eagan Press. 1994. p. 19-36.

Miller JD. Factors that affect the occurrence of fumonisin. *Environ. Health Perspect.* 2001; 109 (Suppl. 2): 321-4.

Mills JT. Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* Species on cereal seeds. *Journal of Food Protection*. 1989; 52: 737- 42.

Missmer SA, Suarez L, Felkner M, Wang E, Merrill Jr. AH, Rothman KJ, Hendricks KA. Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas–Mexico border. *Environ. Health Perspect*. 2006; 114: 237-41.

Moreira IP. *Ecologia das relações entre fungos do grupo Aspergillus ochraceus e outros fungos de armazenamento – Estudos preliminares para controle biológico da produção de ocratoxina A* [dissertação]. São Paulo: Universidade Estadual de Campinas; 1989.

Morrow MB, Meyer GH, Prince HE. A summary of airbone mould surveys. *Ann. Allergy*. 1964; 22: 575-87.

Moss MO. Mycotoxins of *Aspergillus* and other filamentous fungi. *J. Appl. Bacteriol*. 1989; 67 (Suppl.): 69-81.

Mossel DA, Ingram M. The physiology of the microbial spoilage of foods. *J. Appl. Bacteriol*. 1955; 18: 232-68.

Munkvold GP, McGee DC, Carlton WM. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*. 1997; 87: 209-17.

Munkvold GP, Desjardins AE. Fumonisins in maize – Can we reduce their occurrence? *Plant Dis.* 1997; 81: 556-65.

Nelson PE. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia.* 1992; 117: 29-36.

Nelson PE, Touson TA, Marasas WFO. *Fusarium species*. An illustrated manual for identification. Pennsylvania: University Press. 1983. p. 193.

Nirenberg H. 1976. Untersuchungen uber die morphologische und biologische Differenzierung in Die *Fusarium*–Sektion *Liseola*. In: Pitt JL, Hocking AD, editors. *Fungi and food spoilage*. 3rd ed. New York: Springer. 2009. p.121.

Nogueira Júnior S, Nogueira EA, Tsunechiro A. *Considerações sobre a agroindústria do milho*. São Paulo: Instituto Agronômico de Agricultura; 1987. v. 27, p. 1 – 18. (Relatório de Pesquisa).

Norred WP, Vos KA. Toxicity and role of fumonisin in animal diseases and human esophageal cancer. *Food Protect*. 1994; 57: 522-7.

Osweiler GD. *Toxicology*. Philadelphia: Williams & Eilkins. 1996. p. 494.

Paes MCD. *Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho.* Sete Lagoas: Embrapa milho e sorgo. 2006. p. 6 . (Circular Técnica, 75).

Palazzini JM, Ramirez ML, Torres AM, Chul-ze SN. Potential biocontrol agents for *Fusarium* head blight and deoxynivalenol production in wheat. *Crop Protection*. 2007; 26: 1702–10.

Pelczar Júnior MJ. *Microbiologia – Conceitos e Aplicações*. São Paulo: Maakron Books. 1997. p. 381.

Pereira OAP. Doenças do milho. In: Kimati H et al., editors. *Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas*. São Paulo: Agronômica Ceres. 1997. v. 2, p. 538 – 55.

Peterson SW, Ito Y, Horn BW, Goto T. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia*. 2001; 93: 689–703.

Pitt JI, Hocking AD. *Aspergillus* and related teleomorphs. In: Pitt JI et al., editors. *Fungi and food spoilage*. London: Chapman & Hall. 1997. p. 339 – 416.

Pitt JI, Hocking AD. *Fungi and food spoilage*. 3 ed. New York: Springer Gaithersburg. 2009 p. 593.

Pomeranz Y. Biochemical, functional and nutritive changes during storage. In: Christensen CM et al., editors. *Storage of cereal grains and their products*. 1982. p. 145-217.

Raper KB, Fennell DI. *The genus Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wilkins. 1965. p. 686.

Reid LM, Nicol RW, Ouellet T, Savard M, Miller JD, Young JC, Stewart DW, Schaafsma AW. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears: disease progress, fungal biomass and mycotoxin accumulation. *Phytopathology*. 1999; 89: 1028-37.

Rheeder JP, Marasas WFO, Visher HF. Production of fumonisina analogs by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol*. 2002; 68: 2101-5.

Riddell RW. Permanent stained mycological preparations obtained by slid culture. *Mycologia*. 1950; 42: 265-70.

Riley RT, An NH, Showker JL, Yoo HS, Norred WP, Chamberlain WJ, Wang E, Merrill Júnior AH, Motelin G, Beasley VR, et al. Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: an early biomarker of exposure to fumonisin-containing feeds in pigs. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1993; 118: 105-12.

Rodrigues P, Venâncio A, Kozakiewicz Z, Lima N. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *Int. J. Food Microbiol*. 2009; 129: 187–93.

Rossetto CAV, Silva OF, Araújo AES. Influência da calagem, da época de colheita e da secagem na incidência de fungos e aflatoxinas em grãos de amendoim armazenados. *Ciênc. Rural. 2005*; 35: 309-15.

Sabino M. Retrospectiva e situação atual das micotoxinas. In: Encontro Nacional de Micotoxinas; 2004; Piracicaba. Resumos das palestras e trabalhos apresentados. Piracicaba: Laboratório de Micotoxinas – LAN/ESALQ-USP, 2004. p. 10-12.

Samapundo S, Devliehgere F, De Meulenaer B, Debevere J. Effect of water activity and temperature on growth and the relationship between fumonisin production and the radial growth

of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on corn. *J. Food. Prot*. 2005; 68: 1054-9.

Samson RA, Varga J. What is a species in *Aspergillus*? *Med. Mycol.* 2009; 47: 13-20.

Santurio JM. Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. *Rev. Bras. Ciênc*. 2000; 2: 1-12.

Schindler AF, Palmer JG, Eisenberg WV. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* as related to various temperatures. *Appl. Microbiol*. 1967; 15: 1006-9.

Scott PM. Fumonisins. *Int. J. Food Microbiol.* 1993; 18: 257-70.

Scott PM. Natural poisons. In: Helrich K, editor. *Official methods of analysis*. 15th. Arlington: Association of the Official Analytical Chemists; 1990. Cap. 49, p. 1184-213.

Scott PM. Recent research on fumonisins: a review. *Food Addit. Contam*. 2012; 29: 242-8.

Scott PM. Mycotoxins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem*. 1991; 74: 120-8.

Shundo L. *Otimização do método para aflatoxina M_1 em amostras de leite utilizando coluna de imunoafinidade e cromatografia em camada delgada e ocorrência* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo; 2004.

Slliker JH, Elliot RP. *Ecologia Microbiana de los Alimentos*. Zaragoza: Acribia. 1980. v. 1. p. 74-96.

Smith JE, Moss MO. *Mycotoxins: formation, analysis and significance*. Chichester: Whiley. 1985. p. 148.

Smith JE, Ross IC. The toxigenic *Aspergillus*. In: Smith JE, Henderson RS, editors. *Mycotoxins and Animal Foods*. London: CRC Press. 1991. p. 31-61.

Stack ME. Analysis of fumonisin B_1 and its hydrolysis product in tortillas. *J. AOAC Int. 1998;* 81: 737–40.

Steenkamp ET, Wingfield BD, Coutinho TA, Zeller KA, Wingfield MJ, Marasas WFO, Leslie JF. PCR – based identification of *Mat-1* and *Mat-2* in the *Giberella fujikuroi* species complex. *Appl. Environ. Microbiol*. 2000; 66: 4378-82.

Steyn PS. Mycotoxins, excluding aflatoxins, zearalelone and the trichothecenes. In: Rodricks JV, et al., editors. *Mycotoxins in human and animal health*. Illinois: Pathotox Publishers. 1977. p. 419-67.

Stubblefield RD. Thin-layer and high performance liquid chromatographic methods for the analysis of aflatoxins in animal tissues and fluids. In: Richard JL, Thurston JR, editors. *Diagnosis of Mycotoxicoses*. Boston, MA: Martinus Nijhoff. 1986.

Sutton JC. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium earum. Can J Plant Pathol*. 1982; 4: 195-209.

Sweeley CC. Sphingolipids. In: Vance DE, Vance JE, editors. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes***.** Amsterdan: Elsevier Science Publ. 1991.

Sydenham EW, Shepard GS, Thiel PG, Marasas WFO, Stockenstron S. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *J Agric Food Chem*. 1991; 39: 2014-18.

Tanaka T, Yoneda A, Sugiura Y, Inoue S, Takino M, Tanaka A, Shinoda A, Suzuki H, Akiyama H, Toyoda M. An application of liquid chromatography and mass spectrometry for determination of aflatoxins. *Mycotoxins*. 2002; 52: 107-13.

Taniwaki MH, Silva N. da. *Fungos em Alimentos: ocorrência e detecção.* Campinas: Núcleo de Microbiologia/ ITAL. 2001. p. 82.

Trank HL, Hartman PA. Effects of moisture content and temperature on aflatoxin production in corn. *Applied Microbiology*. 1970; 19: 781 – 4.

Visconti A, Solfrizzo M, Girolamo A. Determination of fumonisins B_1 and B_2 in corn and corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity column cleanup: collaborative study. *J. AOAC Int.* 2001; 84: 1828-37.

Wang E, et al. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 1486-90.

Warfield CY, Davis RM. Importance of the husk covering on the susceptibility of corn hybrids to *Fusarium* ear rot. *Plant Disease*. 1996; 80: 208–10.

Warfield CY, Gilchrist DG. Influence of kernel age on fumonisin B_1 production in maize by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol*. 1999; 56: 2853-6.

Waskiewicz A, Beszterda M, Golinski P. Occurrence of fumonisins in food – An interdisciplinary approach to the problem. *Food Control*. 2012; 26: 491-9.

Watson SA, Ramstad PE. *Corn: Chemistry and Technology*. St. Paul (MS): Am. Assoc. Cereal Chem. 1987. p. 349.

Weidenborner M. Foods and fumonisins. *Eur Food Res Technol*. 2001; 212: 262–73.

Woloshuk CP, Shin W. Regulation of fumonisin B_1 biosynthesis and conidiation in *Fusarium verticillioides* by a cyclin-like (C-type) gene, FCC. *Appl. Environ. Microbiol*. 2001; 67: 1607-12.

Woods DM, Duniway JM. Some effects of water potential on growth, turgor, and respiration of *Phytophthora cryptogea* and *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*. 1986; 76: 1248-523.

Yan PS, Song Y, Sakuno E, Nakagima H, Nakagawa H, Yabe K. Cyclo (L-Leucy-L-Prolyl) produced by *Achromobacter xylosanxidans* inhibits aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol*. 2004; 10: 7466-73.

Zhang L, Wang J, Zhang C, Wang Q. Analysis of potential fumonisina-producing *Fusarium* species in corn products from three main maize-producing areas in eastern China. *J. Sci. Food Agric.* 2013; 93: 693-701.

Zorzete P, Castro RS, Pozzi CR, Israel ALM, Fonseca H, Yanaguibashi G, Corrêa B. Relative populations and toxin production by *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* in artificially inoculated corn at various stages of development under field conditions. *J. Sci. Food Agric*. 2008; 88: 48-55.