

LAÍS BARBOSA PRAZERES MENDONÇA

FUMONISINAS E ZEARALENONA EM GRÃOS DE MILHO NO BRASIL

Tese apresentada a Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

M539f
2018

Mendoza, Laís Barbosa Prazares, 1989-
Fumonisina e zearalenona em grãos de milho no Brasil /
Laís Barbosa Prazares Mendoza. – Viçosa, MG, 2018.
ix, 85f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Laércio Zambolim.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Milho - Cultivo. 2. Fusarium sp. 3. Toxinas.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Fitopatologia. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.
II. Título.

CDD 22 ed. 633.1595677

LAÍS BARBOSA PRAZERES MENDONÇA

FUMONISINAS E ZEARALENONA EM GRÃOS DE MILHO NO BRASIL

Tese apresentada a Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 31 de julho de 2018.



Dagma Dionisia da Silva
(Coorientadora)



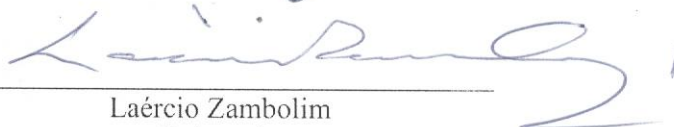
Carlos Eduardo Aucique Perez



Lauro José Moreira Guimarães



Luis Roberto Batista



Laércio Zambolim

*“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e
semeando no fim terás o que colher.”*

Cora Coralina

Aos grandes amigos que me acompanham nessa
caminhada cheia de desafios e alegrias chamada vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e pela força durante a caminhada;

Aos meus pais, Dânio e Sirvone, e a minha irmã, Larissa, pelo apoio e carinho, por me mostrar que sempre terei um porto seguro;

À Noêmia por sempre me apoiar e acreditar que posso ir além;

Ao Pablo que fez parte dessa caminhada, com quem aprendi grandes lições e me apoiou na conclusão deste projeto.

Ao meu orientador Prof. Laércio Zambolim e aos meus co-orientadores Dr. Dagma e Dr. Luciano, pela orientação, ensinamentos, amizade e confiança transmitidos a mim;

Aos membros da banca pelo tempo dedicado à leitura deste trabalho e valiosas contribuições. Em especial ao Dr. Carlos, amigo e conselheiro.

Ao Prof. Fabrício de Ávila Rodrigues, por acreditar em meu potencial, pela amizade, mas principalmente por me ensinar que um profissional com grande conhecimento técnico também pode possuir um grande coração. À Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela oportunidade e ensino;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos oferecida;

Aos professores do Departamento de Fitopatologia (DFP/UFV), pelos valiosos conhecimentos transmitidos durante o curso.

Aos técnicos e funcionários do DFP/UFV pelo auxílio e convivência. Em especial à Sara P. Moreira, pela ajuda e amizade.

À Embrapa Milho e Sorgo pelo material cedido, espaço físico e recursos humanos que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Mars Brasil pelo financiamento e incentivo ao desenvolvimento tecnológico e científico;

Aos pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo Dr. Elena Charlotte Landau, Dr. Daniel Pereira Guimarães, Dr. Antônio Carlos de Oliveira, Dr. Maria Marta Pastina, Dr. Rodrigo Veras da Costa e Dr. Simone Martins Mendes, pelas valiosas contribuições a esse trabalho, ensinamentos e amizade.

Aos pesquisadores, funcionários, bolsistas e estagiários do Núcleo de Fitossanidade (NFIT) da Embrapa Milho e Sorgo pelo harmonioso e alegre convívio. Em especial aos técnicos Clovis e Osni, aos estagiários Bruna e Felipe e ao Pós-doutor Frederick, pela ajuda na condução deste trabalho e amizade.

A todos os meus amigos de Uberlândia, Jaboticabal, Viçosa e Sete Lagoas, cujos nomes são muitos e não quero arriscar esquecer algum. Aqueles que se fizeram presentes em momentos felizes e tristes, perto ou a quilômetros de distância, que me apoiaram, torceram, auxiliaram e confiaram em mim ao longo desta caminhada.

MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA

LAÍS BARBOSA PRAZERES MENDONÇA, filha de Sirvone Rosa Prazeres Mendonça e Dânio Alberto Barbosa Mendonça, nasceu em Uberlândia, Minas Gerais, em 13 de julho de 1989.

Em março de 2007, ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Uberlândia, graduando-se em janeiro de 2012.

Em agosto de 2012, ingressou no Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, na Universidade Estadual Paulista (Unesp), em Jaboticabal, São Paulo. Obteve o título de *Master Scientiae* em julho de 2014.

Em agosto de 2014, iniciou o doutorado em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em julho de 2018.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	6
ARTIGO 1.....	10
Fumonisina e zearalenona em grãos de milho no Brasil: levantamento e georreferenciamento sob diferentes sistemas de cultivos nas principais regiões produtoras.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
2.1 Coleta de amostras	16
2.2 Análises de micotoxinas: fumonisinas e zearalenona	17
2.3 Obtenção de dados climáticos	18
2.4 Mapas de ocorrência de micotoxinas em milho	18
2.5 Análises estatísticas.....	19
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
3.1 Fumonisinias totais no Brasil.....	20
3.2 Zearalenona	24
3.3 Infecções mistas	26
4. CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	33
ARTIGO 2.....	44
Ocorrência de fungos, grãos ardidos, fumonisinas e zearalenona associados ao milho no brasil.....	44
1 INTRODUÇÃO.....	47
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
2.1 Determinação do percentual de grãos ardidos	50
2.2 Análise de patologia de grãos	51
2.3 Análise de micotoxinas	51
2.4 Obtenção de dados climáticos	52
2.5 Análise dos dados	52
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
3.1 Percentual de grãos ardidos	53
3.2 Fungos associados a grãos de milho	53

3.3 Análise de <i>clusters</i>	56
4 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ARTIGO 3.....	68
Uso de redes neurais artificiais na predição da contaminação por fumonisinas e zearalenona em milho	68
1 INTRODUÇÃO.....	71
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	72
2.1 Determinação do percentual de grãos ardidos	73
2.2 Análise de patologia de grãos.....	74
2.3 Análise de micotoxinas	74
2.5 Obtenção de dados climáticos	75
2.6 Análise dos dados	75
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
3.1 Redes neurais artificiais na previsão dos níveis de contaminação por fumonisinas .	76
3.2 Redes neurais artificiais na previsão dos níveis de contaminação por zearalenona .	78
4 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
FIGURAS.....	84
CONCLUSÕES GERAIS	85

RESUMO

MENDONÇA, Laís Barbosa Prazeres, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018 **Fumonisina e zearalenona em grãos de milho no Brasil**. Orientador: Laércio Zambolim. Coorientadores: Dagma Dionísia da Silva e Luciano Viana Cota.

O milho é uma das principais commodities do Brasil. Embora a produtividade da cultura tenha aumentado significativamente nos últimos anos, as micotoxinas produzidas por fungos toxigênicos são uma das principais barreiras para a comercialização de grãos e rações. No Brasil, aproximadamente 45% dos grãos de milho estão contaminados com micotoxinas, o que constitui uma grande preocupação para a saúde humana e animal. Neste trabalho, realizado por uma parceria público-privada, realizamos uma pesquisa sobre a ocorrência de fumonisinas e zearalenona em grãos de milho. As amostras foram coletadas em 173 localidades das quatro principais regiões produtoras, em duas safras de primeira safra (verão) e duas de segunda safra (safra de inverno) nos anos de plantio de 2015 a 2017. Todas as amostras de grãos das três safras foram sujeitas à análise fitopatológica e de micotoxinas e estimativas da porcentagem de grãos podres. Informações sobre o sistema de produção agrícola foram obtidas no momento da amostragem através da aplicação de questionários aos agricultores. Na tentativa de identificar a existência de um padrão entre a ocorrência de micotoxinas em grãos e de chuvas durante o período de crescimento, a ocorrência de grãos podres e fatores do sistema de produção, os dados foram submetidos à análise de Redes Neurais Artificiais. Além disso, foram desenvolvidos mapas mostrando a contaminação de fumonisinas e zearalenona nas regiões produtoras de milho no Brasil.

ABSTRACT

MENDONÇA, Laís Barbosa Prazeres, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018 **Fumonisin and zearalenone in corn grains in Brazil**. Adviser: Laércio Zambolim. Co-advisers: Dagma Dionísia da Silva and Luciano Viana Cota.

Maize is one of the main commodities in Brazil. Although the crop productivity has increased significantly in recent years, mycotoxins produced by toxigenic fungi are one of the major barriers for the grain and feed commercialization. In Brazil, approximately 45% of the corn grains are contaminated with mycotoxins, which constitute a *great concern for human and animal health*. In this work, accomplished by a public-private partnership, we carried out a research on fumonisins and zearalenone incidence in corn grains. The samples were collected in 173 localities from the four main producing regions, in two first-crop (summer crop) and two second-crop (winter crop) over the planting years from 2015 to 2017. All grain samples of the three growing seasons were subject to *phytopathological and mycotoxins analysis* and estimates of the percentage of rot grains. Information on the agricultural production system was obtained at the time of sampling through the application of questionnaires to the farmers. In an attempt to identify the existence of a pattern among the mycotoxins incidence in grains, the occurrence of rainfall during the growing period, incidence rot grains and farming system factors, the data were submitted to the analysis of Artificial Neural Networks. In addition, we developed maps showing the fumonisins and zealarenone incidence in the Brazilian maize producing regions.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil está entre os maiores exportadores de carne suína e de frango. Segundo dados do Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços (IBGE, 2018), o setor de carnes teve destaque entre os itens exportados, com registro de US\$ 5 bilhões em 2017. A cadeia produtiva de carne está fortemente atrelada a produção de grãos. No Brasil, entorno do 75% de todo o milho (*Zea mays*. L) é destinado à ração animal (Duarte *et al.*, 2015), sendo o país o terceiro maior produtor do grão no mundo. Na safra de 2016/17, o país produziu cerca de 99 milhões de toneladas de grãos em uma área plantada de 17,6 milhões de hectares, (CONAB, 2017).

A produção de milho no Brasil é distribuída em duas épocas com características temporais, espaciais e técnicas muito distintas. Na primeira safra ou safra de verão, o plantio é realizado de agosto a novembro. Na segunda safra, também chamada de safra de inverno ou “safrinha”, o plantio se dá nos meses de janeiro a abril (Galvão *et al.*, 2015). A produção na primeira safra está concentrada nas regiões Sul e Sudeste, enquanto na safrinha a produção é basicamente realizada na região Centro-Oeste e em parte do Nordeste, Sudeste e Sul onde o nível técnico é maior (Galvão *et al.*, 2015). A maior parte do milho brasileiro é produzido na “safrinha”, sendo 70% de todo o milho na safra de 2016/17 produzido nesse período (CONAB, 2018). Recentemente, a região Nordeste ganhou expressão na produção deste cereal, pois é possível cultivar o milho em toda a extensão sob diferentes tipos de condições edafoclimáticas e técnicas. A “safra do Nordeste”, no entanto, não se enquadra dentro do calendário agrícola definido para primeira e segunda safra, pois o plantio é realizado nos meses de maio a junho (Carvalho *et al.*, 2000; 2015).

O milho, assim como outros cereais, apresenta elevado valor nutricional e por isso é muito suscetível a incidência de fungos toxigênicos ou não (Soldati, 2010), que estão entre os fatores que limitam a produção e reduzem a qualidade dos grãos. Tais fungos produzem os grãos ardidos, sendo o grão considerado ardido quando apresenta descoloração em ao menos um quarto de sua superfície, resultado do processo fermentativo causado pelo patógeno (Athié *et al.*, 1998; Pinto, 2005). Várias espécies de patógenos podem causar esse tipo de sintoma: *Stenocarpella maydis*, *Stenocarpella macrospora*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Gibberella zeae*, *Penicillium oxalicum*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (Casela *et al.*, 2006). Tais espécies podem

ser classificadas em dois grupos em função da capacidade ou não de produzir micotoxinas; toxigênicas e não toxigênicas (Pinto, 2005).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de fungos, comumente encontradas em alimentos e ração que ocasionam danos a animais e humanos (FAO, 1997; Benett & Klich, 2003) e podem ser produzidas em pré e pós-colheita (Berthiller *et al.*, 2007; Hermanns *et al.*, 2006). Definidas inicialmente por Benett (1987) como “veneno de fungo” (em tradução livre do inglês *fungus poison*), em termos técnicos a definição de micotoxinas, assim como sua classificação, não é fácil. Todas as micotoxinas são moléculas de baixo peso molecular produzidas pelo metabolismo secundário de fungos filamentosos e causam danos a seres humanos e animais em concentrações ínfimas. São substâncias muito estáveis, química e termicamente, por isso resistem às técnicas de processamento utilizadas na indústria e ao trato intestinal dos animais. Sendo assim, os produtos manufaturados e gêneros de origem animal como carne, leite e ovos chegam contaminados ao consumidor final (Soldati, 2010).

As micotoxinas apresentam uma grande variedade de estruturas químicas e podem ser classificadas de diferentes maneiras dependendo do grupo que as estuda. Sendo assim, clinicamente podem ser classificadas quanto ao órgão que ocasiona dano (hepatotoxina, nefrotoxina, imunotoxina, neurotoxina) ou efeito sobre a maquinaria celular (carcinogênica, teratogênica, alergênica, mutagênica), quimicamente (dependendo do grupo químico a que pertence) ou, quando objeto de estudos de micologistas, associando-se ao gênero de fungos que as produzem (Benett & Klich, 2003; Soldati, 2010).

As doenças causadas por essas substâncias são denominadas micotoxicoses e apresentam efeitos análogos à intoxicação com metais pesados e pesticidas. Sendo assim, os sintomas estão diretamente relacionados a intensidade, tempo de exposição e fatores inerentes ao indivíduo como idade, biótipo, estado de saúde, sexo, estado nutricional, dentre outros (Benett & Klich, 2003). Os danos ocasionados podem ser crônicos, mais comuns, ou agudos, observados principalmente em populações de animais. A maioria das pesquisas realizadas com animais, pois é possível demonstrar a relação dose-resposta entre doença e micotoxina. Em humanos, por motivos óbvios, o que se dispõe é de estudos epidemiológicos embasados por modelos desenvolvidos em animais (Benett & Klich, 2003).

Dentre os fungos mais importantes na produção de micotoxinas estão várias espécies do gênero *Fusarium*, associado a diversas doenças em plantas de milho no mundo. As infecções nos grãos podem atingir diferentes órgãos vegetais (sementes, colmo, espiga) e ocorrer em todos os estádios de desenvolvimento da planta, ou durante o armazenamento (Munkvold & Desjardins, 1997). As infecções podem apresentar-se de três formas: (i) assintomática; (ii) presença de listras brancas ou rosas no grão de milho e; (iii) podridão generalizada do grão (Payne, 1999). Os danos ocasionados pelas espécies de *Fusarium* podem ser divididos em dois grupos: (i) perda em rendimento e qualidade, devido à redução de massa, descoloração e necrose dos grãos e; (ii) produção de micotoxinas, responsáveis por micotoxicoses em animais e humanos (Julian *et al.*, 1995).

A colonização dos tecidos por *Fusarium* spp. diverge em infecções sintomáticas e assintomáticas. Em infecções sintomáticas, tem-se crescimento do patógeno nos espaços inter e intracelular, enquanto que em infecções assintomáticas o crescimento só ocorre nos espaços intercelulares (Bacon *et al.*, 1992; 2008; Bacon & Hinton, 1996). Em anos de infecções severas, em um mesmo campo podem haver espigas com diferentes tipos de sintoma, mesmo em híbridos geneticamente homogêneos. À luz dos conhecimentos atuais, ainda não se tem uma explicação para esse tipo de variação (Presello *et al.*, 2007). A espécie *F. verticillioides*, por exemplo, é de natureza sistêmica, por isso a infecção pode ser pontual, atingindo grãos isolados, ou espalhada por toda a espiga. (Bacon *et al.*, 2008).

Existe variação quanto ao tipo de micotoxina produzida entre as espécies de *Fusarium*. *F. graminearum* e *F. culmorum* produzem os principais tricotecenos e zearalenona, enquanto que *F. verticillioides* e *F. proliferatum* podem produzir fumonisinas em elevada quantidade (Parry *et al.*, 1995; Miller, 2008; Rocha *et al.*, 2014). *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* são frequentemente associadas a podridões em grãos de milho e o dano mais expressivo é, em inúmeras vezes, a redução na qualidade de grãos e sementes devido a produção de fumonisinas (Munkvold & Desjardins, 1997; Figueira *et al.*, 2003).

As fumonisinas, reportadas primeiramente por Bezuidenhout *et al.* (1988), são o grupo de micotoxinas de maior importância para a cultura do milho (Munkvold & Desjardins, 1997; Figueira *et al.*, 2003; Stockmann-Juvala & Savolaine, 2008). Estruturalmente, são similares a esfingolípídios intermediários, tais como esfinganina e esfingosina (Bezuidenhout *et al.*, 1988). Conseqüentemente, sua atuação está

relacionada a interrupção do metabolismo de esfingolipídios, através da inibição da ceramida sintase (Wang *et al.*, 1991).

As fumonisinas podem ser categorizadas em 5 grupos estruturalmente correlatos (A, AK, B, C e P). O Grupo B, entretanto, compreende a maioria das fumonisinas encontradas em condições de campo. A fumonisina B1 é encontrada em grande quantidade em milho, enquanto FB2 e FB3 ocorrem em pequenas quantidades. (Stockmann-Juvala & Savolaine, 2008).

Em animais, as fumonisinas podem ocasionar diversos tipos de danos, como edemas pulmonares e alterações fisiológicas em suínos; problemas cardiovasculares e leucoencefalomacia (LEM) em equinos; redução no desenvolvimento corporal, perda de peso e diarreia em aves; e, em condições experimentais, câncer de rim e fígado em ratos (Howard *et al.*, 2001; Figueira *et al.*, 2003; Stockmann-Juvala & Savolaine, 2008). Em seres humanos, o metabolismo das fumonisinas ainda é pouco conhecido. Todavia, estudos epidemiológicos mostraram uma correlação positiva entre câncer esofágico e ocorrência de *F. verticillioides* em milho ou trigo. Essa associação foi verificada em diversos países como África do Sul, China, Irã, Itália, Quênia, Zimbábue, Estados Unidos e Brasil, em áreas pobres onde a população tem dietas menos variadas. Há alguns relatos de má formação do tubo neural de fetos na fronteira entre Texas e México e em algumas regiões africanas (Figueira *et al.*, 2003; Stockmann-Juvala & Savolaine, 2008).

Outras micotoxinas relevante é a zearalenona, que ocorre principalmente no milho contaminado por *F. graminearum* e *F. culmorum* (Bennett & Klich, 2003). A zearalenona é mais comum em condições de elevada umidade e temperaturas mais amenas. Por ser análogo ao estrógeno, a zearalenona afeta a reprodução, causando hiperestrogenismo em suínos, redução da produção de leite, alterações na tireoide, hipertrofia das glândulas mamárias, redução do peso dos testículos e produção de testosterona em machos, mudanças na puberdade infantil e é um possível agente carcinogênico humano (Iamanaka *et al.*, 2010; Peraica *et al.*, 2014).

A biossíntese de micotoxinas ocorre tanto em campo quanto no armazenamento e pode estar relacionada a diferentes fatores (Lesllie & Summerell, 2006; Leslie & Logrieco, 2014). Estresse hídrico, principalmente na fase após colonização do tecido hospedeiro (Jurado *et al.*, 2008; Fanelli *et al.*, 2013), habilidade toxigênica de diferentes isolados do patógeno (Nelson *et al.*, 1991; Picot *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2011; Lanza *et al.*, 2014) e temperatura (Jurado *et al.*, 2008; Fanelli *et al.*, 2013).

Embora existam muitos esforços em todo o mundo para desenvolver estratégias de manejo que possam reduzir os danos e prejuízos causados, sejam eles no campo, armazenamento ou processamento industrial (Leslie & Logrieco, 2014), muitas dificuldades são encontradas no estudo das micotoxinas. Os métodos de detecção são onerosos e a distribuição irregular da contaminação em um mesmo lote traz muitos problemas à análise de dados (Rensburg *et al.*, 2011; Escrivá *et al.*, 2017). Grandes variações são observadas mesmo em ensaios laboratoriais sob condições controladas (Marín *et al.*, 2004). Sob condições de campo é ainda mais difícil devido à complexidade das interações entre clima, hospedeiro, sistema de plantio, patógeno e biossíntese (Torelli *et al.*, 2012).

No Brasil, estima-se que cerca de 45% do milho é contaminado com micotoxinas e que os custos anuais entre manejo e análises para assegurar a qualidade dos grãos estejam na ordem de US\$ 450 milhões (Santurio, 2000). No 2007, de toda a produção brasileira de milho, aproximadamente 13 milhões de toneladas de grãos estavam contaminadas com fungos toxigênicos, fato que gerou grandes perdas econômicas para o agronegócio (Lorini & Bacaltchuck, 2007).

Diante dos problemas sociais e econômicos devido a contaminação por micotoxinas, a legislação mundial impõe limites máximos tolerados – LMTs. No Brasil, os níveis de micotoxinas é regulamentado pela RDC N° 07, de 18 de fevereiro de 2011 e entrou em vigor total em 1° de janeiro de 2017 (ANVISA, 2018). Para milho, os valores aceitos para fumonisinas e zearalenonas em grãos de milho são 5000 ppm e 400 ppm, respectivamente.

Neste contexto, na tentativa de fornecer novas informações sobre a ocorrência de fungos toxigênicos, fumonisinas e zearalenona nas principais regiões produtoras de milho no Brasil, os objetivos deste trabalho foram:

- i.* Disponibilizar o panorama da distribuição geográfica de fumonisinas e zearalenona no Brasil;
- ii.* Identificar associações entre os níveis de contaminação por micotoxinas e precipitação, características de híbrido e sistemas de manejo adotados nas principais regiões produtoras do Brasil;
- iii.* Determinar os percentuais de grãos ardidos e sua correlação com a intensidade de contaminação por fumonisinas e zearalenona em milho;
- iv.* Identificar os principais gêneros de fungos associados à grãos ardidos e sadios em milho;

- v. Avaliar o uso de Redes Neurais Artificiais pra prever o acúmulo de fumonisinas e zearalenona em milho nas principais regiões produtoras de milho do Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Athié, I., Castro, M. F. P. M., Gomes, R. A. R., Valentini, S. R. T. 1998. Conservação de grãos. Campinas. Fundação Cargill. 236p.

Bacon, C. W., Glenn, A. E., Yates, I. E. 2008. *Fusarium verticillioides*: endophytic association with maize for reduce fumonisins accumulation. Toxin Reviews 27:411-446.

Bacon, C. W., Bennett, R. M., Hinton, D. M., Voss, K. A. 1992. Scanning electron microscopy of *Fusarium moniliforme* within asymptomatic corn kernels and kernels associated with equine leukoencephalomalacia. Plant Disease 76:144-148.

Bacon, C. W., Hinton, D.M. 1996. Fusaric acid and pathogenic interactions of corn and non-corn isolates of *Fusarium moniliforme*, a non-obligate pathogen of corn. In: Jackson, L.S.; DeVries, J.W.; Bullerman, L.B. Fumonisins in food, Plenum Press, p. 175-191.

Bennett, J. W., Klich, M. 2003. Mycotoxins. Clinical Microbiology Review 16:497-516.

Bezuidenhout, S. C., Gelderblom, W. C. A., Gorst-Allman, C. P., Horak, R. M., Marasas, W. F. O., Spiteller, G., Vlegaar, R. 1988. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. Journal of the Chemical Society 1476:743-745.

BRASIL, 2017. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 138, de 8 de fevereiro de 2017. Altera a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n° 7, de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, para alterar os LMT da micotoxina deoxinivalenol (DON) em trigo e produtos de trigo prontos para oferta ao consumidor e os prazos para sua aplicação. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3219534/RDC_138_2017_.pdf/b36e60b0-5112-43dc-9142-932f502fc46b?version=1.0>. Acesso em Abril de 2017.

Carvalho, H. W., Cardoso, M. J., Leal, M. L. S., do Santos M. X., Tabosa, J. M., de Souza, E. M. 2000. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho no Nordeste brasileiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira 35:1115-1123.

Carvalho, H. W. L., Cardoso, M. J., Pacheco, C. A. P., Costa, E. F. N., Rocha, L. M. P., Oliveira, I. R., Guimaraes, P. E., Tabosa, J. N., Cavalcanti, M. H. B., Oliveira, T. R. A., Moitinho, A. C., dos Santos, D. L., Marques, M. G., Porto, E. S., Araujo, S. B. 2017. Recomendação de cultivares de milho no Nordeste brasileiro: safra 2015. Embrapa Tabuleiros Costeiros-Comunicado Técnico 203. 29p.

Casela, C. R., Ferreira, A. S., Pinto, N. F. J. A. 2006. Doenças da cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo- Circular técnica 83. 14 p.

CONAB. 2017. Levantamento de safra da cultura da milho. <http://www.conab.gov.br>. Acesso em Julho 2017.

CONAB. 2018. Levantamento de safra da cultura da milho. <http://www.conab.gov.br>. Acesso em Maio 2018.

Duarte, J. O., Garcia, J. C., Miranda, R. A. 2015. Mercado e comercialização. Em: Pereira-Filho IA. 2015. Cultivo do milho, 9ª Edição. Embrapa. https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemaasdeproducao1f6_1gal1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=7905&p_r_p_-996514994_topicoId=8668. Acesso em Julho 2017.

Escrivá, L. Font, G., Manyes, L., Berrada, H. 2017. Studies on the presence of mycotoxins in biological samples: an overview. *Toxins* 9:251.

Fanelli, F., Inversen, A., Logrieco, A. F., Mulè, G. 2013. Relationship between fumonisin production and FUM gene expression in *Fusarium verticillioides* under different environmental conditions. *Food Additives & Contaminants: Part A* 30:365-371.

Figueira, E. L. Z., Coelho, A. R., Ono, E. Y. S., Hirooka, E. Y. 2003. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. *Ciências Agrárias* 24:359-378.

Galvão, J. C. C., Trogello, E., Pereira, L. P. L. 2015. Milho Segunda Safra. Em: Borém, A.; Galvão, J. C. C.; Pimentel, M. A. Milho: do plantio a colheita. Editora UFV, Viçosa, 2015.

Howard, P. C., Eppley, R. M., Stack, M. E., Warbritton, A., Voss, K. A., Lorentzen, R. J., Kovach, R. M., Bocce, T. J. 2001. Fumonisin B1 carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3F1 mice. *Environmental Health Perspectives suppl.* 2:277-282.

Iamanaka, B. T., Oliveira, I. S., Taniwaki, M. T. 2010. Micotoxinas em alimentos. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica* 7:138-161.

IBGE. (2018) Estatística da Produção Pecuária. https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:LH2LXMwVCcsJ:https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/media/com_mediaibge/arquivos/13cd1316db83af017e82a7621772766c.doc+&cd=3&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br Acesso em Julho 2018.

Julian, A. M., Wareing, P. W., Phillips, S. I., Medlock, V. F. P., MacDonald, M. V., Río, L. E. 1995. Fungal contamination and selected mycotoxins in pre- and postharvest maize in Honduras. *Mycopathologia* 129:5-16.

Jurado, M., Marín, P., Magan, N., González-Jaén, M. T. 2008. Relationship between solute and matric potential stress, temperature, growth, and FUM1 gene expression in

two *Fusarium verticillioides* strains from Spain. Applied and Environmental Microbiology 74:2032-2036.

Lanza, F. B., Zambolim, L., Costa, R. V., Queiroz, V. A. V., Cota, L. V., Silva, D. D., Souza, A. G. C., Figueiredo, J. E. F. 2014. Prevalence of fumonisin-producing *Fusarium* species in Brazilian corn grains. Crop Protection 65:232-237.

Leslie, F. F., Logrieco, A. 2014. Micotoxins reduction in grains chains. Wiley-Blackwell, USA, 376p.

Leslie, J. F., Summerell, B. A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. 1. ed. USA: Blackwell Publishing. 388p.

Lorini, I., Bacaltchuk, B. A. 2007. Qualidade desejada na armazenagem de grãos no país. Ambiente em Foco. Disponível em: <<http://w.w.w.ambienteemfoco.com.br/?p=5019>>. Acesso em: 24 ago. 2015.

Marín, S., Magan, N., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2004. Fumonisin-producing strains of *Fusarium*: a review of their ecophysiology. J. Food Prot. 8, 1792-1805.

Miller, J. D. 2008. Mycotoxins in small grains and maize: old problems, new challenges. Food Additives and Contaminants 25:219-230.

Munkvold, G. P., Desjardins, A. E. 1997. Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence? Plant Disease: 81:556-565.

Nelson, P. E., Planttner, R. D., Shackelford, D. D., Desjardins, A. E. 1991. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. Applied and Environmental Microbiology 57:2410-2412.

Parry, D. W., Jenkinson, P., McLeod, L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review. Plant pathology 44:207-238.

Payne, G. A. 1999. Ear and kernel rots. Em: White, D.G. (Ed.), Compendium of Corn Diseases, 3th ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA, pp. 44-49.

Peraica, M., Richter, D., Rašić, D. Mycotoxicoses in children. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology 65:347-363.

Picot, A., Barrean, C., Pinson-Gadais, L., Caron, D., Lannou, C., Richard-Forget, F. 2010. Factors of the *Fusarium verticillioides*-maize environment modulating fumonisin production. Critical Reviews in Microbiology. 36:221-231.

Pinto, N. F. J. A. 2005. Grãos ardidos em milho. Embrapa Milho e Sorgo, Circular técnica, 66. 6p.

Presello, D. A., Iglesias, J., Botta, G., Eyherabide, G. H. 2007. Severity of *Fusarium* ear rot and concentration of fumonisin in grain of Argentinian maize hybrids. Crop Protection 26:852-855.

- Rensburg, B. J., Flet, B. C., McLaren, N. W., McDonald, A. H. 2011. Sampling variation in the quantification of fumonisins in maize samples. *South African Journal of Plant and Soil* 28:90-96.
- Rocha, M. E. B., Freire, F. C. O., Maia, F. E. F., Guedes, M. I. F., Rondina, D. 2014. Mycotoxin and their effects on human and animal health. *Food Control* 36:159-165.
- Rocha, L. O., Reis, G. M., da Silva, V. N., Braghini, R., Teixeira, M. M., Corrêa, B. 2011. Molecular characterization and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* isolated from corn grains of different geographic origins in Brazil. *International journal of food microbiology* 145:9-21.
- Santurio, J. M. 2000. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. *Revista Brasileira de Ciencia Avícola* 2:1-12.
- Soldati, R. C. 2010. *Micotoxinas em alimentos vegetais*. Ixtlan, Viçosa. 120p.
- Stockmann-Juvala, H., Savolaine, K. 2008. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisina B1. *Human & Experimental toxicology* 27:799-809.
- Torelli, E., Firrao, G., Bianchi, G., Saccardo, F., Locci, R. 2012. The influence of local factors on the prediction of fumonisin contamination in maize. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92:1808-1814.
- Wang, E., Norred, W. P., Bacon, C. W., Riley, R. T., Merrill, A. H. 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *Journal of Biological Chemistry* 266:14486-14490.

ARTIGO 1

Fumonisina e zearalenona em grãos de milho no Brasil: levantamento e georreferenciamento sob diferentes sistemas de cultivos nas principais regiões produtoras

RESUMO

A ocorrência de micotoxinas pode comprometer drasticamente a segurança alimentar do milho consumido por humanos e animais. Considerando os danos que podem ocasionar à saúde é necessário que seus níveis sejam constantemente monitorados a fim de otimizar as estratégias de manejo praticadas. O objetivo foi caracterizar a distribuição geográfica de fumonisina e zearalenona e associar sua ocorrência à precipitação e características de híbrido e sistemas de manejo adotados no cultivo do milho. Foram coletadas amostras de grãos de milho nas principais regiões produtoras do Brasil no período de 2015 a 2017. De um total de 989 amostras, 82,9% foram positivas para fumonisinas dessas, apenas 12,6% estavam acima de $5000 \mu\text{g kg}^{-1}$, que é o Limite máximo tolerado – LMT, estabelecido pela legislação brasileira. Das 652 amostras avaliadas para zearalenonas e dessas, observou-se 20,4% de positividade, dos quais somente 4% apresentaram valores superiores ao LMT ($400 \mu\text{g kg}^{-1}$). As fumonisinas apresentaram ampla distribuição no território brasileiro. Enquanto a zealeronona, embora ainda ocorra mais no Sul do país, deve ser monitorada à medida que a cultura do trigo se expande para a região de cerrado. Somente em três amostras fumonisina e zearalenona co-ocorreram acima do LMT. Não foi possível determinar um padrão entre a intensidade de ocorrência de fumonisinas e zearalenona com precipitação, textura de grãos, presença de tecnologia Bt, sistema de plantio e uso de aplicação de fungicida.

/

Palavras chave: alimento seguro; fumonisinas; zearalenona; *Fusarium verticillioides*; *Fusarium graminearum*.

ABSTRACT

The occurrence of mycotoxins can drastically compromise the food safety of corn consumed by humans and animals. Considering the significant damages that can cause health is necessary that their levels are constantly monitored in order to optimize the management strategies practiced. The objective was to characterize the geographic distribution of fumonisin and zearalenone and to associate their occurrence with the precipitation and hybrid characteristics and management systems adopted in corn cultivation. Samples were collected from maize grains in the main producing regions of Brazil from 2015 to 2017. Of 989 samples, 82.9% were positive for fumonisins of these, only 12.6% were above 5000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, which is the maximum tolerated limit - LMT, established by Brazilian legislation. 652 samples were evaluated for zearalenones and 20.4% positivity was observed, of which only 4% presented values higher than LMT (400 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Fumonisin were widely distributed in Brazil. Zealarone, although still occurring more in the south of the country, should be monitored as the wheat crop expands to the cerrado region. In only 3 samples fumonisin and zearalenone co-occurred above the LMT. It was not possible to determine a pattern between the intensity of occurrence of fumonisins and zearalenone with precipitation, grain texture, presence of Bt technology, planting system and use of fungicide application.

Keywords: food safety; fumonisina; zearalenona; *Fusarium verticillioides*; *Fusarium graminearum*.

1 INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) é estratégica em programas de segurança alimentar. Em conjunto com o arroz e o trigo, representa 30% das calorias ingeridas diariamente por 4,5 bilhões de pessoas, principalmente nos países em desenvolvimento (CIMMYT/CGIAR, 2014). Nos países mais desenvolvidos, a maior parte do milho produzido, entre 70 e 85%, é destinado a ração animal, interferindo diretamente sobre a cadeia produtiva de carne, leite e ovos (Paes, 2006).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, na safra de 2016/17, com área plantada de 17,6 milhões de hectares, produziu cerca de 99 milhões de toneladas de grãos (USDA, 2018). A produção no país é distribuída em duas épocas, a primeira safra ou safra de verão (plantio de agosto a novembro, dependendo da região) e segunda safra, também chamada de safra de inverno ou “safrinha” (plantio de janeiro a abril, dependendo da região) (Galvão *et al.*, 2015). Além da diferença temporal, essas safras apresentam nítida variação diferencial espaciais, enquanto na primeira safra a produção está concentrada nas regiões Sul e Sudeste, na safrinha, a produção está centrada na região Centro-Oeste, com grande destaque para o estado do Mato Grosso (Galvão *et al.*, 2015). A segunda safra é responsável por produzir a maior parte do milho brasileiro, aproximadamente 68,43% na safra 2016/17 (MAPA, 2016). Mais recentemente, a região Nordeste do Brasil adquiriu expressividade na produção de milho. No Nordeste é possível cultivar o milho em toda a extensão sob diferentes tipos de condições edafoclimáticas e técnicas. A safra do Nordeste, no entanto, não se enquadra dentro do calendário agrícola definido para primeira e segunda safra, haja vista que o plantio é realizado nos meses de janeiro e maio, dependendo de cada local (Carvalho *et al.*, 2000; 2015).

Devido ao seu elevado valor nutritivo, o milho, assim como outros cereais, é muito suscetível a incidência de fungos, sendo que algumas espécies são produtoras de micotoxinas, dentre elas destaca-se o gênero *Fusarium* (Munkvold & Desjardins, 1997; Soldati, 2010). Esse gênero é associado a diversas doenças em milho, as infecções podem atingir diferentes órgãos vegetais (sementes, colmo, espiga) e ocorrer em todos os estádios de desenvolvimento ou durante o armazenamento (Munkvold & Desjardins, 1997). Os danos ocasionados pelas espécies de *Fusarium* podem ser divididos em dois grupos: (i) perda em rendimento e qualidade, devido à redução de

massa, descoloração e necrose dos grãos e; (ii) produção de micotoxinas, responsáveis por micotoxicoses em animais e humanos (Julian *et al.*, 1995).

Dentre as espécies de *Fusarium* há uma diferença quanto ao tipo de micotoxina produzida, *F. graminearum* e *F. culmorum* produzem os principais tricotecenos e zearalenona, enquanto *F. verticillioides* e *F. proliferatum* produzem fumonisinas em elevada quantidade (Parry *et al.*, 1995; Miller, 2008; Rocha *et al.*, 2014). *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* são frequentemente associados a podridões em grãos de milho e o dano mais expressivo é, em inúmeras vezes, a redução na qualidade de grãos e sementes devido a produção de fumonisinas (Munkvold & Desjardins, 1997; Figueira *et al.*, 2003).

As fumonisinas podem ocasionar diversos tipos de danos à saúde animal, como edemas pulmonares e alterações fisiológicas em suínos; problemas cardiovasculares e leucoencefalomacia (LEM) em equinos; redução no desenvolvimento corporal, perda de peso e diarreia em aves e, em condições experimentais, câncer de rim e fígado em ratos (Figueira *et al.*, 2003; Howard *et al.*, 2001; Stockmann-Juvala & Savolaine, 2008). Em seres humanos, o metabolismo das fumonisinas ainda é pouco conhecido. Todavia, estudos epidemiológicos mostraram uma correlação positiva entre câncer esofágico e ocorrência de *F. verticillioides* em milho ou trigo. Essa associação foi verificada em diversos países como África do Sul, China, Irã, Itália, Quênia, Zimbábue, Estados Unidos e Brasil, em áreas pobres onde a população tem dietas menos variadas. Há alguns relatos de má formação do tubo neural de fetos na fronteira entre Texas e México e em algumas regiões africanas (Figueira *et al.*, 2003; Stockmann-Juvala & Savolaine, 2008).

As fumonisinas podem ser categorizadas em 5 grupos estruturalmente correlatos (A, AK, B, C e P). O Grupo B é o mais importante, pois compreende a maioria das fumonisinas encontradas em condições de campo, particularmente FB1, encontrada em grande quantidade em milho, e FB2, que embora encontrada em menores quantidades é comum ocorrer simultaneamente (Nelson *et al.*, 1993; Stockmann-Juvala & Savolaine, 2008). As fumonisinas FB1 e FB2, não só ocorrem em maior frequência, como também apresentam maior toxicidade (Seo & lee; 1999; Labuda *et al.*, 2003), por isso na legislação vigente no Brasil considera-se as fumonisinas totais, ou seja, o somatório de FB1 e FB2. O limite máximo tolerado (LMT) estabelecido pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) de (FB1+FB2) é de 5.000 µg.kg⁻¹ em milho para posterior processamento (BRASIL, 2017).

A zearalenona apresenta alta atividade biológica. Sua estrutura mimetiza o 7 β -estradiol, hormônio produzido normalmente pelos ovários de fêmeas, por isso é corriqueiramente classificado como estrogênio não-esteroidal ou micoestrogênio (Bennet & Klinch, 2003). Em intoxicações com zearalenona os sintomas mais comuns são inflamações nos órgãos genitais de fêmeas, atrofia testicular nos machos, infertilidade em animais adultos e perda de peso (Soldati, 2010). Em seres humanos, pode apresentar efeito hepatotóxico, afetar parâmetros hematológicos e imunológicos, induzir a morte celular, inibir a síntese de DNA e proteínas, peroxidar lipídios e ocasionar efeitos genotóxicos (Gao *et al.*, 2013). O limite máximo tolerado (LMT) estabelecido pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) de zearalenona é de 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em milho para posterior processamento (BRASIL, 2017).

Em consequência dos sérios danos causados à saúde humana e animal, em diversos países foram criadas legislações específicas para as micotoxinas. Muitos grupos de pesquisa dedicam-se ao monitoramento, avaliação de estratégias de manejo e ecofisiologia de micotoxinas (Leslie & Logrieco, 2014; Marín *et al.*, 2004). No Brasil, diversos trabalhos de levantamento por Pozzi *et al.* (1995) e Orsi *et al.*, (2000), em Ribeirão Preto, SP; Bento *et al.* (2012) no Mato Grosso; Queiroz *et al.* (2012) em Minas Gerais; Stumpf *et al.* (2013) no Rio Grande do Sul; Valmorbida *et al.* (2018) em Rondônia; Oliveira *et al.* (2017) na Região Sul do Brasil evidenciam resultados que se limitam a regiões específicas com as particularidades próprias de cada situação, fato que dificulta as interpretações a uma escala nacional. No entanto, Lanza *et al.* (2014) coletaram espigas com grãos ardidos e assintomáticos em 15 pontos localizados em 12 estados brasileiros (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Bahia, Pará e Roraima), pesquisa que permitiu compreender em uma maior extensão a ocorrência de *Fusarium* spp. e micotoxinas na cultura do milho no Brasil.

Neste trabalho buscou-se oferecer o panorama da distribuição de fumonisinas e zearalenona nas principais regiões produtoras do país. Ao todo foram analisadas 989 amostras coletadas em 173 municípios, 11 estados e no Distrito Federal, em duas safras e duas safrinhas no período entre 2015 e 2017. O objetivo foi caracterizar a distribuição geográfica de fumonisina e zearalenona e associar sua ocorrência à precipitação e características de híbrido e sistemas de manejo adotados no cultivo do milho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado nos Laboratórios de Fitopatologia de Sanidade de grãos da EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, em uma parceria público-privada entre a EMBRAPA e Mars Brasil.

2.1 Coleta de amostras

As coletas de grãos foram realizadas em duas safras de verão (primeira safra), 2015 e 2016, e duas safrinhas (segunda safra) nos anos de 2015 e 2016. Além disso, realizou-se uma coleta no ano de 2016 na “Safrinha do Nordeste”. Em todos os casos, as amostragens foram realizadas no período de pico de colheita. Para cada ciclo de coletas foram recolhidas informações relacionadas com as características agrônômicas de cada lugar (Tabela 1).

A escolha dos locais de amostragem foi realizada de acordo com os mapas de distribuição da produção de milho no Brasil na primeira e segunda safra. Os mapas utilizados foram elaborados por Landau *et al.* (2013) e embasaram-se no banco de dados disponibilizados pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). As coletas referentes à primeira safra ocorreram nos estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, região Oeste da Bahia, Maranhão, Piauí, Pernambuco e Sergipe. Na segunda safra foram realizadas coletas nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, São Paulo, Goiás e Minas Gerais e na safra Nordeste, as amostragens foram realizadas na Bahia e Sergipe.

As amostras foram obtidas sob condições de campo de duas maneiras: i) amostras de grãos; ii) amostras de espigas. No momento da colheita foram retiradas subamostras em vários pontos dos caminhões. As amostras simples foram homogeneizadas e uma amostra composta de 1 kg de grãos foi subtraída. As coletas de grãos foram realizadas somente quando havia a certeza de que apenas um híbrido seria colhido no talhão. A amostragem de espigas se deu em ocasiões em que a visita à propriedade não coincidiu com o momento da colheita ou não se podia afirmar que o milho no caminhão pertencia a um único híbrido. As espigas, após a maturação fisiológica, foram coletadas de forma aleatória. O procedimento padrão adotado nessas circunstâncias estabeleceu uma distância mínima de segurança de 50 m entre a bordadura dos talhões e os pontos de amostragem de espigas. Evitando-se a coleta em

áreas sujeitas a interferência externas e buscando-se maior representatividade da área em questão. Em cada ponto, foram coletadas, no mínimo 30 espigas por amostra. Após as coletas, as espigas foram debulhadas, os grãos homogeneizados e uma amostra final de 1 kg foi retirada.

As amostras obtidas em campo foram encaminhadas à Embrapa Milho e Sorgo, e, quando necessário, submetidas à secagem até atingir 13% de umidade. Em seguida, os grãos foram novamente homogeneizados e separados em sub amostras de 0,5 kg. A seguir, 0,5 kg das amostras foram encaminhadas para análise de micotoxinas em laboratórios especializados e a outra parte foi encaminhada para o laboratório de sanidade para isolamento e quantificação dos fungos.

Em cada ponto de coleta foram registradas as coordenadas geográficas (latitude e longitude) com o auxílio de um GPS, para posterior correlação dos teores de fumonisinas e zearalenona com os dados climáticos e confecção de mapas de ocorrência. Além disso, no momento da coleta de amostras foram aplicados questionários padronizados onde foram levantadas informações referentes a híbridos, data de plantio, data de coleta, sistema de preparo do solo (plantio direto ou convencional), espaçamento, população de plantas, aplicação de fungicidas e outros procedimentos adotados na lavoura

2.2 Análises de micotoxinas: fumonisinas e zearalenona

As análises de fumonisinas (B1, B2 e totais) da safrinha 2015 foram realizadas no Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC), da Universidade Federal de Santa Maria, em Santa Maria – RS. As demais análises foram realizadas no Laboratório Soluções Analíticas Microbiológicas e Tecnológicas (SAMITEC), em Santa Maria, RS.

As análises foram realizadas por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS) como descrito por Oliveira *et al.* (2017). Os limites de quantificação (LQ) e os coeficientes de recuperação (%) para FB1 foram de 125 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 101% e para FB2 de 125 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 96%. As estimativas de incerteza foram: FB1 ($\pm 33,2 \mu\text{g kg}^{-1}$; $K=2,18$) e FB2 ($\pm 35,2 \mu\text{g kg}^{-1}$; $K=2,52$). O fator K foi obtido a partir dos graus de liberdade efetivos da incerteza, e é um fator multiplicador adimensional (expresso por um número simples) da incerteza. Como a legislação brasileira (BRASIL, 2011) não considera as fumonisinas separadamente, os

valores de FB1 e FB2 foram somados para obtenção do valor de fumonisinas totais (FBT). Assim, para as análises subsequentes deste trabalho foram utilizados os valores de FBT.

As análises de zearalenona foram realizadas nas amostras coletadas na safrinha 2015, safra 2015/16 e safrinha 2016. Neste caso, também foi utilizada a metodologia LC-MS/MS descrita por Oliveira *et al.* (2017). O limite de detecção foi de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, o coeficiente de recuperação de 85,0% e a estimativa de incerteza de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (0,53 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

2.3 Obtenção de dados climáticos

Considerando o tempo que cada amostra permaneceu no campo (plântio à coleta) e localização georreferenciada de cada ponto de amostragem fez-se o levantamento do índice pluviométrico por decêndio. Para isso utilizou-se a base de dados CHIRPS - Climate Hazards Group InfraRed Precipitation with Station (<http://chg.geog.ucsb.edu/data/chirps/>).

2.4 Mapas de ocorrência de micotoxinas em milho

Para elaboração dos mapas foram considerados os limites estaduais delimitados pela malha municipal dos municípios brasileiros disponibilizados pelo IBGE (2015). A eles foram correlacionadas as respectivas coordenadas geográficas obtidas em campo, o teor de fumonisinas e zearalenona e a área relativa média de milho plantada nos anos de 2015 e 2016 (IBGE, 2016). No caso da zearalenona, os dados também foram confrontados com a área relativa média de trigo plantada nos anos de 2015 a 2017 (IBGE, 2016). Em todos os mapas, a área relativa média da produção de milho ou trigo nos municípios foi descrita em escala variando de 0,1 a > 50% da área cultivada.

Para fumonisinas foram gerados cinco mapas considerando a ocorrência de fumonisinas totais, sendo eles: ocorrência geral no Brasil no período entre 2015 e 2017, na safrinha 2015, na safra 2015/16, Safra Nordeste de 2016, safrinha 2016 e safra 2016/17. Foram aplicadas escalas de cores variando de 0 - 2500; 2500 - 5.000; 5.000 - 7.500; 7.500 - 10.000 e > 10.000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. A escala foi baseada no nível de 5.000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, limite máximo tolerado para grãos de milho no Brasil (BRASIL, 2017).

Para zearalenonas, foram gerados cinco mapas. Quatro desses mapas foram correlacionados à produção de milho no Brasil e um à produção de trigo. Os mapas correlacionados a produção de milho foram: ocorrência geral e os demais para ocorrência na safrinha 2015, safra 2015/16 e safrinha 2016. Foi aplicada escala de cor variando de 0 - 100; - 100 - 200; 200 - 400; 400 - 800; > 800 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A escala foi baseada no nível de 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$, limite máximo tolerado para grãos de milho no Brasil (BRASIL, 2017). O mapa correlacionado à produção de trigo no Brasil considerou somente a incidência geral e utilizou a mesma escala que os anteriores.

2.5 Análises estatísticas

Além da elaboração de mapas utilizou-se também análise exploratória de dados, utilizou-se a ferramenta estatística *boxplot* buscando uma maior visualização das medidas de tendência central quanto ao nível de contaminação por micotoxinas.

Na análise exploratória foram contemplados os níveis de contaminação por fumonisinas e zearalenona em associação com duas variáveis relacionadas ao híbrido (textura dos grãos e presença de tecnologia *Bt*) e duas variáveis relacionadas ao manejo da cultura do (sistema de plantio e número de aplicações de fungicida). Os dados de precipitação também foram submetidos à essa análise. O objetivo foi identificar os tipos de padrões entre esses fatores e a intensidade de contaminação por micotoxinas. Devido à alta variabilidade relatada nos níveis de contaminação por micotoxinas (Coker *et al.*, 1995; Escrivá *et al.*, 2017; Rensburg *et al.*, 2011), optou-se por manter os *outliers*. As análises com *boxplot* foram feitas com Minitab® Statistical Software.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Fumonisinias totais no Brasil

Ao todo, foram analisadas 989 amostras de grãos de milho, das quais 82,9% foram positivas para fumonisinias em 17,1% apresentaram valores $< LQ$. No entanto, deve-se ressaltar que a não-deteção não garante a ausência de micotoxina, pois a metodologia utilizada tem um LQ, que para fumonisinias em LC-MS/MS é de $125 \mu\text{g kg}^{-1}$. Das amostras contaminadas, 87,3% apresentaram índice de contaminação inferior ao LMT de $5.000 \mu\text{g kg}^{-1}$ e 12,7% valores superiores ao LMT. Entre as amostras com teores de fumonisinias acima do LMT, 3,5% apresentaram valores acima de $10.000 \mu\text{g kg}^{-1}$. Cerca de 74% das amostras que superaram o LMT pertenciam a cinco estados, em ordem decrescente: São Paulo (17,3%), Paraná (17,3%), Goiás (13,5), Minas Gerais (13,5%) e Bahia (12,5%).

No período em que foram realizadas as amostragens, entre janeiro de 2015 a julho 2017, em todas as épocas e estados brasileiros as fumonisinias totais apresentaram ampla distribuição, embora ocorram diferentes níveis de contaminação. Na Figura 1, observa-se a distribuição da ocorrência de fumonisinias e sua intensidade (demonstrada pelos ícones na escala de cor entre tons de verde e vermelho), os valores de fumonisinias variaram de $125 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($>LQ$) (em 25 municípios distribuídos em todos os estados avaliados) a $54.348,50 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Unai, MG). No mapa, a escala de cinza variando de cinza claro a cinza escuro, mostra a área cultivada de milho no período, sendo as menores e maiores áreas relativas médias por município, variando entre 0,01 e 50%, respectivamente.

A safra Nordeste apresentou a menor média para fumonisinias $732,2 \mu\text{g kg}^{-1}$. Para os demais períodos, quando comparados os valores médios da taxa de fumonisinias totais observou-se que não houve uma relação entre a safra ou a safrinha em termos de ocorrência ou intensidade de contaminação. Na safrinha de 2015 e na safra de 2016 os teores médios de fumonisinias foram próximos, $1864,45 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $1407,76 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Enquanto os valores encontrados para a safrinha 2016 ($2687,03 \mu\text{g kg}^{-1}$) e a safra de 2015 ($2712,89 \mu\text{g kg}^{-1}$) foram similares. Ao analisar o percentual de amostras cujos teores de fumonisinias totais superaram o limite máximo tolerado (LMT) (Figura 2), o mesmo comportamento é observado.

O menor valor na safra Nordeste (1,8%), percentuais intermediários na safrinha de 2015 (9,9%) e a safra de 2016/2017 (5,7%) e o maiores valores na safrinha 2016 (14,4%) e safra 2015/2016 (15,9%). Essas porcentagens mostram que primeira e segunda safra podem apresentar perfis similares em relação à ocorrência de micotoxinas, dependendo do ano avaliado. Na figura 3 tem-se o mapeamento por época de amostragem.

Os resultados encontrados corroboram com dados obtidos anteriormente por outros autores. Segundo Rodríguez-Amaya & Sabino (2002) altos índices de fumonisinas foram encontrados no Brasil na década de 90 e dentre os trabalhos realizados nesse período, os teores de fumonisinas totais variaram entre 150 e 78.470 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ no milho não processado e, de 50 a 6.320 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ em produtos à base de milho. Maziero & Bersot (2010) compilaram resultados de trabalhos desenvolvidos na década de 2000 e verificaram a ocorrência de diferentes taxas de contaminação por micotoxinas em basicamente todos os cereais cultivados, sendo as fumonisinas mais preocupantes em milho. Assim como neste trabalho, outros estudos mostraram que mesmo a contaminação por fumonisinas sendo muito frequente, na maioria dos casos, a taxa de contaminação está abaixo do LMT estabelecido pela legislação brasileira em vigor (Orsi *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2012; Queiroz *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2017).

A dispersão das fumonisinas no Brasil pode ser explicada pela ocorrência massiva de *F. verticillioides*. As fumonisinas podem ser sintetizadas por diferentes espécies de *Fusarium*, todavia a produção de altas concentrações dessa toxina é realizada pelas espécies *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum* (Leslie & Logrieco, 2014). *F. verticillioides* tem uma relação patogênica muito estreita com o milho, sendo encontrada em todas as áreas de cultivo (Leslie & Summerell, 2008), e é relatada em diversos locais do mundo como a principal espécie associada à grãos de milho (Gatch & Munkvold, 2002; Fandohan *et al.*, 2003; Rahjoo *et al.*, 2008; Venturini *et al.*, 2011; Madania *et al.*, 2013; Fu *et al.*, 2015). Situação similar ocorre no Brasil, Rocha *et al.* (2011) avaliaram 100 isolados obtidos em grãos de milho em quatro estados, desses 96 isolados foram identificados como *F. verticillioides*. Lanza *et al.* (2014) avaliaram 230 isolados obtidos em espigas de milho de 12 estados brasileiros e identificaram que 99% dos isolados pertenciam a espécie *F. verticillioides*.

F. verticillioides, assim como outros fungos toxicogênicos, pode crescer na faixa de temperatura entre 10 °C e 40 °C (Leslie & Logrieco, 2014) embora o

desenvolvimento ótimo se dê em 25°C (Leslie & Summerell, 2008). Quanto a umidade, o desenvolvimento ótimo se dá acima de 20% (Leslie & Logrieco, 2014). Para a produção de fumonisinas a faixa de temperatura ótima está entre 20 °C e 30 °C e associado a elevada umidade nos grãos, atividade de água 0,99 (Marín *et al.*, 2004). Embora o desenvolvimento do fungo e a biossíntese de fumonisinas requeiram condições similares de temperatura e umidade, principalmente sob condições de campo não há obrigatoriamente uma correlação positiva entre crescimento de *F. verticillioides* e produção de fumonisinas (Leslie & Logrieco, 2014; Leslie & Summerell, 2008).

Os fatores ambientais podem interferir consideravelmente sobre a biossíntese de fumonisinas. Jurado *et al.* (2008) através de ensaios cinéticos demonstraram que o estresse hídrico pode ser um fator relevante para acumulação de fumonisinas, principalmente nas fases que sucedem a colonização do tecido do hospedeiro. Resultados semelhantes foram encontrados por Fanelli *et al.* (2013), Marin *et al.* (2004) e Jurado *et al.* (2008). Em situação de campo, Ono *et al.* (1999) verificaram que a precipitação no mês anterior à colheita influenciou significativamente a ocorrência de fumonisinas em amostras de milho obtidas no estado do Paraná.

Os dados de precipitação obtidos para cada área foram submetidos à análise de *boxplot*. Foram feitos *boxplots* para os dados de precipitação na floração (entre o 5° e o 9° decêndio) e no mês que antecedeu a colheita para dois grupos de amostras em todos os períodos avaliados: i) teor de fumonisinas totais menor que o limite quantificável (LQ = 125 µg kg⁻¹); ii) teor de fumonisinas totais maior do que o limite máximo tolerado (LMT = 5.000 µg kg⁻¹). De acordo com os gráficos observa-se que o padrão da precipitação é muito semelhante para ambos os grupos associados à época (Figura 4). Ao analisá-los separadamente em cada período, mesmo que se verifique algumas divergências quanto a amplitude das precipitações, ao analisar o segundo quarto (mediana) e o terceiro quarto, não é possível encontrar diferenças expressivas que permitam realizar inferências sobre a biossíntese de fumonisinas.

Os demais fatores avaliados com *boxplots* estão na figura 5. As variáveis presença de tecnologia Bt, textura dos grãos, sistema de plantio e número de aplicações de fungicidas, também não permitiram visualizar algum tipo de tendência de maneira

assertiva. A grande quantidade de *outliers* impede a identificação de um padrão claro de distribuição para os teores de fumonisinas totais.

A ocorrência de valores muito discrepantes de micotoxinas mesmo em lotes de grãos muito parecidos é comum (Coker *et al.*, 1995; Rensburg *et al.*, 2011; Escrivá *et al.*, 2017). Cada etapa do processo de detecção (amostragem, conservação e preparação das amostras e a metodologia de detecção e quantificação) contém um erro embutido e diversas vezes é difícil identificar em qual etapa houve algum problema (Shepard *et al.*, 2012). Whitaker *et al.* (1998) identificou que o coeficiente de variação para diferentes metodologias na determinação de fumonisinas totais estava na ordem 45%, em contraponto Mallmann *et al.* (2013) observaram que uma amostragem bem feita e o uso de amostras processadas tornam a quantificação de micotoxinas mais acurada.

A despeito do grande número do grande volume de amostras obtidas em diversos locais do Brasil, através de uma análise exploratória não foi possível afirmar quais variáveis atuam de maneira mais significativa sobre a ocorrência de fumonisinas. Os teores obtidos nas amostras são muito variáveis mesmo para as amostras de mesma região ou onde houve o mesmo padrão de precipitação.

A produção de micotoxinas é complexa e envolve uma série de fatores inerentes ao ambiente, ao hospedeiro e ao patógeno (Leslie & Logrieco, 2014). Uma das explicações para grande variação nos teores de micotoxina nas amostras analisadas pode estar na variabilidade presente entre diferentes isolados de *F. verticillioides* quanto ao potencial toxicogênico já demonstrado por vários autores (Lanza *et al.*, 2014; Nelson *et al.*, 1991; Picot *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2011).

3.2 Zearalenona

Os teores de zearalenona foram avaliados em três épocas de plantio, nas Safrinhas de 2015 e 2016 e na Safra de 2015/2016, em 652 amostras. Dessas, detectou-se zearalenona em 20,4% das amostras, sendo que em 4% foram encontrados valores acima de 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$, LMT determinado pela ANVISA (BRASIL, 2017). Em 1,4% das amostras, os teores de zearalenona foram acima de 800 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

A distribuição espacial de zearalenona no Brasil está descrita na figura 6. Entre os doze estados onde foram realizadas amostragens, em oito foram detectou-se zearalenona: Paraná, Rio grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso; Mato Grosso do Sul e Goiás. Entre os pontos de amostragem, cujo teor de zearalenona encontrava-se acima do LMT, 34,6% foram encontrados no Rio Grande do Sul, 26,9% em São Paulo e Paraná, 7,7% em Goiás e 3,9% no Mato Grosso do Sul. Valores acima de 800 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ foram encontrados no Rio Grande do Sul e São Paulo (36,7% cada), Paraná (18,2%) e Goiás (9,1%).

Em relação a épocas de semeadura, a intensidade média de contaminação por zearalenona nas amostras foi de: 24,8% na safrinha 2015; 25,7% na Safra 2015; 10,7% na Safrinha 2016. Destas, índices de contaminação acima do LMT foram detectados em 23,6% das amostras na Safrinha de 2015, 18,2% na Safra 2015 e 13,0% na Safrinha de 2015 (Figura 7).

Ao se comparar as precipitações para as amostras de zearalenona com teores abaixo do limite quantificável (LQ= 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e acima do limite máximo tolerado pela legislação (LMT = 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$), observa-se novamente a mesmas tendências que para fumonisina quanto ao segundo e terceiros quartis dos *boxes* em cada período

analisado (Figura 8). Assim, para zearalenona a análise exploratória também não identificou nenhum padrão contundente quanto a precipitação. Ao se analisar as variáveis relacionadas aos híbridos (textura de grãos e tecnologia *Bt*) e ao sistema de cultivo (sistema de plantio e número de aplicações de fungicida) também não é possível identificar nenhuma tendência. Há um grande número de amostras em que não ocorreu zearalenona e basicamente todas as amostras positivas apresentam comportamento *outlier* (Figura 9). Para o sistema de plantio convencional observa-se que não ocorreu zearalenona. Mesmo que existam trabalhos afirmando que a adoção do plantio direto tenha aumentado a incidência de alguns patógenos como *Fusarium* (Del Ponte *et al.*, 2004; Toledo-Souza *et al.*, 2012), a base do *box* mostra que a quantidade de amostras analisadas em plantios convencional é pequena, não permitindo maiores explicações.

A ocorrência de zearalenona foi associada a área plantada de trigo no Brasil. Dentre as espécies produtoras de zearalenona a espécie *F. graminearum* predomina no território brasileiro nos locais onde se cultiva o trigo (Del Ponte *et al.*, 2004). O trigo e *F. graminearum* apresentam uma estreita relação advinda de um longo período coevolutivo (Mesterhazy, 1995). Uma vez que *F. graminearum* também é patógeno de outras poaceas como aveia, cevada e milho (Leslie & Summerell, 2008) os teores de zearalenona deste estudo foram interpolados com a disposição da cultura do trigo no país (figura 10).

Na região Sul do Brasil a fusariose da espiga ou giberela em trigo ocorre em epidemias severas, causando muitas perdas em produtividade e qualidade de grãos (Del Ponte *et al.*, 2004; Maziero & Bersot, 2010; Almeida-Ferreira *et al.*, 2013;). Devido as suas condições ambientais e ao cultivo intensivo do trigo e outros cereais de inverno no estado do Rio Grande do Sul são encontrados as maiores taxas de incidência da doença, bem como elevados teores de micotoxinas produzidas por essa espécie, tricotecenos e zearalenona (Sabino *et al.*, 1989).

Todavia, à medida que a cultura do trigo se expande para as regiões Sudeste e Centro-Oeste, poderá aumentar a ocorrência de zearalenona na cultura do milho. Este fato pode ser exemplificado pelo que ocorreu em uma amostra do município de Mineiros, Goiás, que apresentou concentração de 841 $\mu\text{g kg}^{-1}$. De acordo com a base histórica de dados do IBGE, constata-se que este local é pioneiro no cultivo do trigo em larga escala na região do cerrado, os primeiros plantios datando da década de 1990. Já na região de Santa Catarina o cenário é oposto, embora faça parte da região Sul,

tradicional no cultivo cereais de inverno, não foram encontradas concentrações de zearalenona acima do LMT, infere-se que uma das possíveis razões é a área muito modesta destinada ao cultivo do trigo (Figura 10).

3.3 Infecções mistas

Ao se comparar isoladamente as micotoxinas, os grãos de milho do Brasil podem ser classificados, em sua maior parte como seguros. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com outro da literatura. A contaminação por fumonisina é muito frequente, mas na maioria dos casos contaminação está abaixo do LMT estabelecido pela legislação em vigor (Orsi *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2012; Queiroz *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2017). A contaminação por zearalenona, não só é menos comum em milho, mas também, entre as amostras positivas uma pequena quantidade está acima do LMT (Maziero & Bersot, 2010; Queiroz *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2017). Todavia, dois pontos importantes devem ser considerados, os efeitos de infecções por múltiplas micotoxinas e o efeito cumulativo das micotoxinas no organismo.

Ao analisar o dano causado pelas micotoxinas individualmente pode-se subestimar os danos causados à saúde de seres humanos e animais, pois existem efeitos sinérgicos ou aditivos, ainda que, em alguns casos também ocorram efeitos antagônicos entre micotoxinas (Bracarense *et al.*, 2012). Alguns levantamentos indicam a co-ocorrência de micotoxinas, em cereais utilizados para alimentação humana e animal, principalmente das biossintetizadas por *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp. (Ali *et al.*, 1998; Schothorst & Egmond, 2004; Kawashima & Soares, 2006; Binder *et al.*, 2007; Queiroz *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2017). Oliveira *et al.* (2017) ao estudar 148 amostras obtidas nos estados Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina observaram co-contaminação de fumonisinas totais e zearalenona em 73,6% das amostras. Existem poucas pesquisas sobre infecções crônicas por micotoxinas e esse número é ainda menor quando se trata de contaminações por micotoxinas combinadas. Os dados disponíveis mostram que a longo prazo muitas toxinas estão associadas principalmente a ocorrência de câncer (Fung *et al.*, 2004; Cortinovis *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2015).

4. CONCLUSÃO

As fumonisinas estão disseminadas por todas as principais regiões produtoras de milho no Brasil, porém somente em 13% das 989 amostras estavam acima do LMT;

A zearalenona está concentrada na região Sul e sudeste do estado de São Paulo, porém a medida que a cultura do trigo se expande por outras regiões do país, a contaminação por zearalenona tende a aumentar;

Das 652 amostras avaliadas, 4% apresentaram teores de zearalenona acima do LMT;

Três amostras fumonisina e zearalenona co-ocorreram acima do LMT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ali, N., Sardjono., Yamashita, A., Yoshizawa, T. 1998. Natural co-occurrence of aflatoxins and *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) in corn from Indonesia. *Food Additives & Contaminants* 15:377-384.

Almeida-Ferreira, G. C., Barbosa-Tessmann, I. P., Sega, R., Junior, M. M. 2013. Occurrence of zearalenone in wheat-and corn-based products commercialized in the State of Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 44:371-375.

Bento, L. F., Caneppele, M. A. B., Albuquerque, M. C. F., Kobayashi, L., Caneppele, C., Andrade, P. J. (2012). Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. *Instituto Adolfo Lutz* 71: 44-49.

BRASIL, Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 138, de 8 de fevereiro de 2017. Altera a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n° 7, de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, para alterar os LMT da micotoxina deoxinivalenol (DON) em trigo e produtos de trigo prontos para oferta ao consumidor e os prazos para sua aplicação. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3219534/RDC_138_2017_.pdf/b36e60b0-5112-43dc-9142-932f502fc46b?version=1.0>. Acesso em 04/05/2017.

Bennett, J. W., Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review* 16:497-516.

Binder, E. M., Tan, L. M., Chin, L. J., Handl, J., Richard, J. 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal feed science and technology* 137:265-282.

Bracarense, A. P., Luciola, J., Grenier, B., Drociunas-Pacheco, G., Moll, W. D., Schatzmayr, G., Oswald, I. P. 2012. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. *British Journal of Nutrition* 107:1776-1786.

Carvalho, H. W., Cardoso, M. J., Leal, M. L. S., do Santos M. X., Tabosa, J. M., de Souza, E. M. 2000. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho no Nordeste brasileiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35:1115-1123.

Carvalho, H. W. L., Cardoso, M. J., Pacheco, C. A. P., Costa, E. F. N., Rocha, L. M. P., Oliveira, I. R., Guimaraes, P. E., Tabosa, J. N., Cavalcanti, M. H. B., Oliveira, T. R. A., Moitinho, A. C., dos Santos, D. L., Marques, M. G., Porto, E. S., Araujo, S. B. 2017. Recomendação de cultivares de milho no Nordeste brasileiro: safra 2015. *Embrapa Tabuleiros Costeiros-Comunicado Técnico* 203. 29p.

Cortinovis, C., Caloni, F., Schreiber, N. B., Spicer, L. J. 2014. Effects of fumonisin B1 alone and combined with deoxynivalenol or zearalenone on porcine granulosa cell proliferation and steroid production. *Theriogenology* 81:1042-1049.

CIMMYT/CGIAR (International Maize and Wheat Improvement Center/Consultative Group on International Agricultural Research) Disponível em: <<http://maize.org/maize-crp-infographic/>> Último acesso em 12/11/2014.

Coker, R. D., Nagler, M. J., Blunden, G., Sharkey, A. J., Defize, P. R., Derksen, G. B., Whintaker, T. B. 1995. Design of sampling plans for mycotoxins in foods and feeds. *Natural Toxins* 3:257-262.

Del Ponte, E. M., Fernandes, J. M. C., Pierobom, C. R., Bergstrom, G. C. 2004. Aspectos epidemiológicos e modelos de previsão. *Fitopatologia Brasileira* 29:587-605.

Escrivá, L. Font, G., Manyes, L., Berrada, H. 2017. Studies on the presence of mycotoxins in biological samples: an overview. *Toxins* 9:251.

Fanelli, F., Inversen, A., Logrieco, A. F., Mulè, G. 2013. Relationship between fumonisin production and FUM gene expression in *Fusarium verticillioides* under different environmental conditions. *Food Additives & Contaminants: Part A* 30:365-371.

Fandohan, P., Hell, K., Marasas, W. F. O., Wingfield, M. J. 2003. Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in Africa. *African Journal of Biotechnology* 2:570-579.

Figueira, E. L. Z., Coelho, A. R., Ono, E. Y. S., Hirooka, E. Y. 2003. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. *Ciências Agrárias* 24:359-378.

Fu, M., Li, R., Guo, C., Pang, M., Liu, Y., Dong, J. 2015. Natural incidence of *Fusarium* species and fumonisins B1 and B2 associated with maize kernels from nine provinces in China in 2012. *Food Additives & Contaminants: Part A* 32:503-511.

Fung, F., Clark, R. F. 2004. Health effects of mycotoxins: a toxicological overview. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* 42:217-234.

Galvão, J. C. C., Trogello, E., Pereira, L. P. L. 2015. Milho Segunda Safra. Em: Borém, A.; Galvão, J. C. C.; Pimentel, M. A. Milho: do plantio a colheita. Editora UFV, Viçosa, 2015.

Gatch, E. W., Munkvold, G. P. 2002. Fungal species composition in maize stalks in relation to European corn borer injury and transgenic insect protection. *Plant disease* 86:1156-1162.

Gao, F., Jiang, L. P., Chen, M., Geng, C. Y., Yang, G., Ji, F., Zhong, L. F., Liu, X. F. 2013. Genotoxic effects induced by zearalenone in a human embryonic kidney cell line. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 755:6-10.

Grubbs, F. E. 1969. Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics* 11:1-21.

IBGE. Malhas digitais. Disponível em: <ftp://geoftp.ibge.gov.br/organizacao_do_territorio/malhas_territoriais/malhas_municipais/municipio_2015/> Acesso em: 03/07/2018.

IBGE. Mapas temáticos. Disponível em: <<https://mapas.ibge.gov.br/tematicos.html>> Acesso em: 03/07/2018.

Río, L. E. 1995. Fungal contamination and selected mycotoxins in pre- and postharvest maize in Honduras. *Mycopathologia* 129:5-16.

Jurado, M., Marín, P., Magan, N., González-Jaén, M. T. 2008. Relationship between solute and matric potential stress, temperature, growth, and FUM1 gene expression in two *Fusarium verticillioides* strains from Spain. *Applied and Environmental Microbiology* 74:2032-2036.

Kawashima, L. M., Soares, L. M. V. 2006. Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26:516-521.

Labuda, R., Tancinova, D., Hudec, K. 2003. Identification and enumeration of *Fusarium* species in poultry feed mixtures from Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 10:61-66.

Landau, E., Hirsch, A., Guimaraes, D., Moura, L., dos Santos, A. H., Nery, R. 2015. Variação geográfica da produção de grãos e principais culturas agrícolas no Brasil em 2013. Embrapa Milho e Sorgo, Documentos 182, 143pp.

Lanza, F. B., Zambolim, L., Costa, R. V., Queiroz, V. A. V., Cota, L. V., Silva, D. D., Souza, A. G. C., Figueiredo, J. E. F. 2014. Prevalence of fumonisin-producing *Fusarium* species in Brazilian corn grains. *Crop Protection* 65:232-237.

Leslie, F. F., Logrieco, A. 2014. *Micotoxins reduction in grains chains*. Wiley-Blackwell, USA, 376p.

Leslie, J. F., Summerell, B. A. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. 1. ed. USA: Blackwell Publishing. 388p.

- Madania, A., Altawil, M., Naffaa, W., Volker, P.H., Hawat, M. 2013. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* isolated from maize in Syria. *Journal of Phytopathology*: 161:452-458.
- Marín, S. Magan, N., Ramos, A. J., Sanchis, V. 2004. Fumonisin-producing strains of *Fusarium*: a review of their ecophysiology. *Journal of food protection* 67:1792-1805.
- Martins, F. A., Ferreira, F. M. D., Ferreira, F. D., Bando, E., Nerilo, S. B., Hirooka, E. Y., Machinski Jr, M. 2012. Daily intake estimates of fumonisins in corn-based food products in the population of Parana, Brazil. *Food Control* 26:614-618.
- Maziero, M. T., Bersot, L. S. 2010. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais* 12:89-99.
- Mesterhazy, A. 1995. Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. *Plant breeding* 114:377-386.
- Miller, J. D. 2008. Mycotoxins in small grains and maize: old problems, new challenges. *Food Additives and Contaminants* 25:219-230.
- Munkvold, G. P., Desjardins, A. E. 1997. Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence? *Plant Disease*: 81:556-565.
- Nelson, P. E., Planttner, R. D., Shackelford, D. D., Desjardins, A. E. 1991. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. *Applied and Environmental Microbiology* 57:2410-2412.
- Oliveira, M. S., Rocha, A., Sulyok, M., Krska, R., Mallmann, C. A. 2017. Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region of Brazil. *Food Control* 73:127-132.
- Mallmann, O. A., Machioro, A., Oliveira, M. S., Minetto, M., Wovst, L. R. S., Rauber, R. H., Dilkin, P., Mallmann, C. A. 2013. Dois planos de amostragem para análise de fumonisinas em milho. *Ciência Rural* 43:551-558.
- Orsi, R. B., Corrêa, B., Possi, C. R., Schammass, E. A., Nogueira, J. R., Dias, S. M. C., Malozzi, M, A. B. 2000. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. *Journal of Stored Products Research* 36:75-87.
- Ono, E. Y. S., Sugiura, Y., Homechin, M., Kamogae, M., Vizzoni, E., Ueno, Y., Hirooka, E. Y. 1999. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil. *Mycopathologia* 47:139-148.
- Paes, M. C. D. 2006. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo.
- Parry, D. W., Jenkinson, P., McLeod, L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review. *Plant pathology*. 44:207-238.

- Picot, A., Barrean, C., Pinson-Gadais, L., Caron, D., Lannou, C., Richard-Forget, F. 2010. Factors of the *Fusarium verticillioides*-maize environment modulating fumonisin production. *Critical Reviews in Microbiology*. 36:221-231.
- Pereira, K. C., dos Santos, C. F. 2015. Micotoxinas e seu potencial carcinogênico. *Ensaio e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde* 15.
- Pozzi, C. R., Corrêa, B., Gambale, W., Paula, C. R., Chacon-Reche, N. O., Meirelles, M. C. A. 1995. Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxin occurrence. *Food Additives & Contaminants* 12:313-319.
- Queiroz, V. A. V., Alves, G. L. O., Ferreira, P.; Conceição, R. R. P., Guimarães, L. J. M., Mendes, S. M., Ribeiro, P. E. A., Costa, R. V. 2012. Occurrence of fumonisins and zearalenone in maize stored in family farm in Minas Gerais, Brazil. *Food Control* 28:83-86.
- Rahjoo, V., Zad, J., Javan-Nikkhah, M., Gohari, A.M., Okhovvat, S.M., Bihanta, M.R., Razzaghian, J., Klemsdal, S.S. Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. *Journal Plant Pathology* 90:463-468.
- Rensburg, B. J., Flet, B. C., McLaren, N. W., McDonald, A. H. 2011. Sampling variation in the quantification of fumonisins in maize samples. *South African Journal of Plant and Soil* 28:90-96.
- Rocha, M. E. B., Freire, F. C. O., Maia, F. E. F., Guedes, M. I. F., Rondina, D. 2014. Mycotoxin and their effects on human and animal health. *Food Control* 36:159-165.
- Rocha, L. O., Reis, G. M., da Silva, V. N., Braghini, R., Teixeira, M. M., Corrêa, B. 2011. Molecular characterization and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* isolated from corn grains of different geographic origins in Brazil. *International journal of food microbiology* 145:9-21.
- Rodríguez-Amaya, D. B., Sabino, M. 2002. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. *Brazilian Journal of Microbiology* 33:1-11.
- Sabino, M. Prado, G., Inomata, E. I., Pedroso, M. O., Garcia, R. B. 1989. Natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in maize in Brazil. Part II. *Food Additives & Contaminants* 6:327-331.
- Seo, J. A., Lee, Y. W. 1999. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. *Applied and environmental microbiology* 65:1331-1334.
- Shephard, G. S., Berthiller, F., Burdaspal, P. A., Crews, C., Jonker, M. A., Krska, R. 2013. Developments in mycotoxin analysis: An update for 2011-2012. *World Mycotoxin Journal* 6:3-30.
- Soldati, R. C. 2010. *Micotoxinas em alimentos vegetais*. Ixtlan, Viçosa. 120p.
- Stumpf, R. dos Santos, J., Gomes, L. B., Silva, C. N., Tessmann, D. J., Ferreira, F. D., Machinski Jr, M., Del Ponte, E. M. 2013. *Fusarium* species and fumonisins associated with maize kernels produced in Rio Grande do Sul State for the 2008/09 and 2009/10 growing seasons. *Brazilian Journal of Microbiology* 44:89-95.

Stockmann-Juvala, H., Savolaine, K. 2008. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisina B1. *Human & Experimental toxicology* 27:799-809.

Schothorst, R. C.; van Egmond, H. P. 2004. Report from SCOOP task 3.2. 10 “collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states”: Subtask: trichothecenes. *Toxicology letters* 153:133-143.

USDA. World Agricultural Production. Circular Series, WAP 6-8, June, 2018. Disponível em: < <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf> >.

Toledo-Souza, E. D., Silveira, P. M., Café-Filho, A, C., Lobo Junior, M. 2012. *Fusarium* wilt incidence and common bean yield according to the preceding crop and the soil tillage system. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 47:1031-1037.

Valmorbida, R., Savi, G. D., Silva, J. R., Yanez, M. M. O., Soares, C. E. S., Runtzel, C., Nascimento, P. N., Scussel, V. M. 2018. Quality and safety of maize (*Zea mays* L.) from Rondônia state storage units, Northern Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part B* 11:54-63.

Venturini, G., Assante, G., Vercesi, A. *Fusarium verticillioides* contamination patterns in Northern Italian maize during the growing season. *Phytopathology. Meditterrenea* 50:110-120.

Williamson, D. F., Parker, R. A., Kendrick, J, S. 1989. The box plot: a simple visual method to interpret data. *Annals of internal medicine* 110:916-921.

Whitaker, T. B. Trucksess, M. W., Johansson, A. S., Giesbrecht, F. G., Hagler, W. M. Jr., Bowman, D. T. 1998. Variability associated with testing shelled corn for fumonisin. *Journal of AOAC International* 81:1162-1168.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Formulário de coleta de informações agronômicas aplicado para a obtenção de amostras

Formulário de coleta de informações	
AMOSTRAS DE GRÃOS DE MILHO PARA ANÁLISE DE MICOTOXINA, 2017.	
Amostra número	
Dados georeferenciados	
Local (Município/Estado)	
Cultivar plantado	
Data de plantio	
Data de colheita	
Plantio direto: Sim ou não	
Espaçamento x densidade de plantas	
Aplicação de fungicidas: sim ou não. qual? Dose? Modo de aplicação?	
Observação Umidade:	
Amostra número	
Dados georeferenciados	
Local (Município/Estado)	
Cultivar plantado	
Data de plantio	
Data de colheita	
Plantio direto: Sim ou não	
Espaçamento x densidade de plantas	
Aplicação de fungicidas: sim ou não. qual? Dose? Modo de aplicação?	
Observação Umidade:	
Amostra número	
Dados georeferenciados	
Local (Município/Estado)	
Cultivar plantado	
Data de plantio	
Data de colheita	
Plantio direto: Sim ou não	
Espaçamento x densidade de plantas	
Aplicação de fungicidas: sim ou não. qual? Dose? Modo de aplicação?	
Observação Umidade:	
Amostra número	
Dados georeferenciados	
Local (Município/Estado)	
Cultivar plantado	
Data de plantio	
Data de colheita	
Plantio direto: Sim ou não	
Espaçamento x densidade de plantas	
Aplicação de fungicidas: sim ou não. qual? Dose? Modo de aplicação?	
Observação Umidade:	

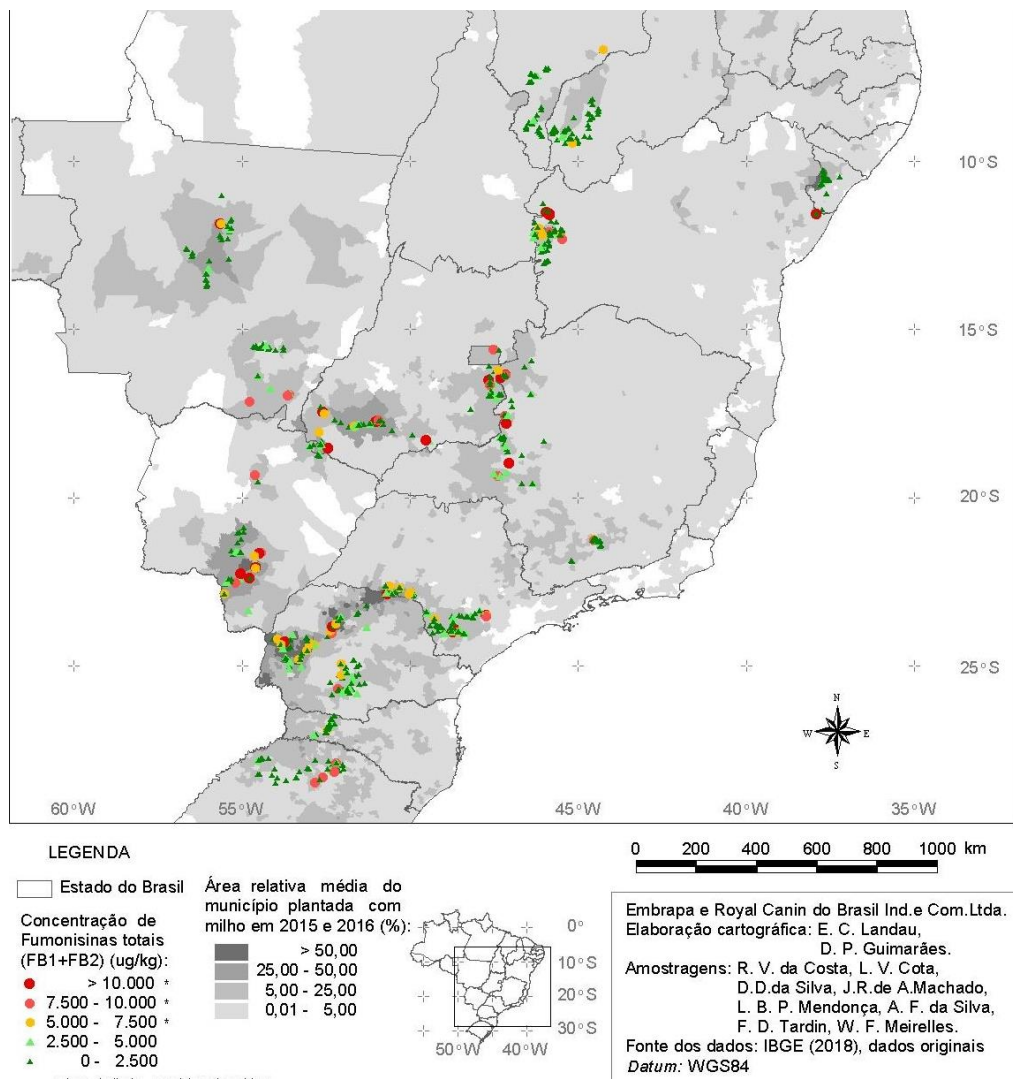


Figura 1. Ocorrência de fumonisinas totais no Brasil de janeiro de 2015 a julho de 2017.

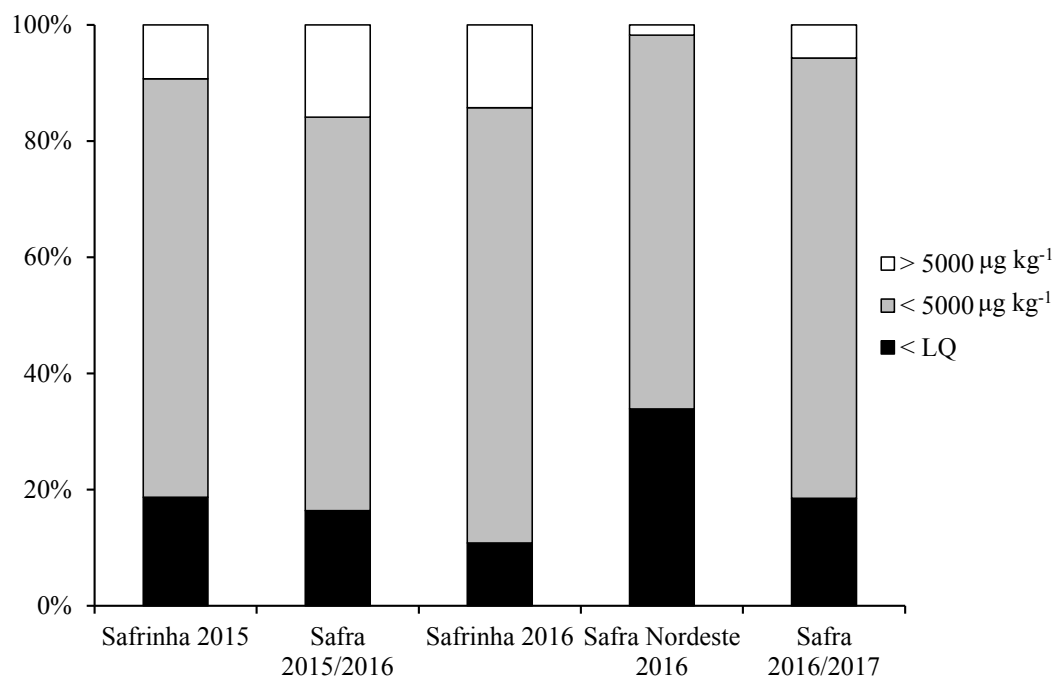


Figura 2. Distribuição percentual das amostras analisadas em cada período de coleta em função do teor de fumonisinas totais.

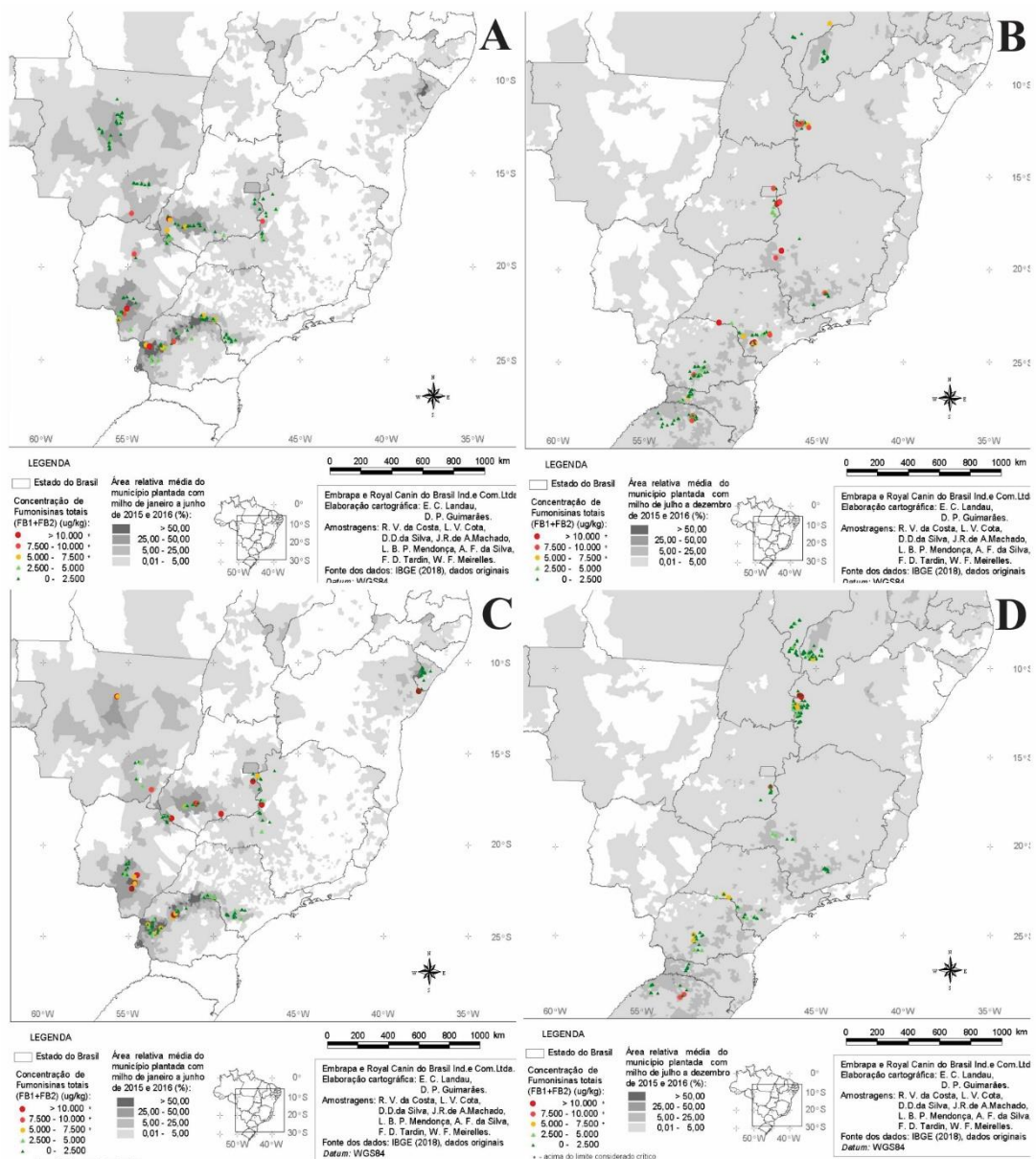


Figura 3. Ocorrência de fumonisinas totais no Brasil por época de plantio. A) Safrinha 2015. B) Safra 2015/2016. C) Safra Nordeste 2016 e Safrinha 2016. D) Safra 2016/2017.

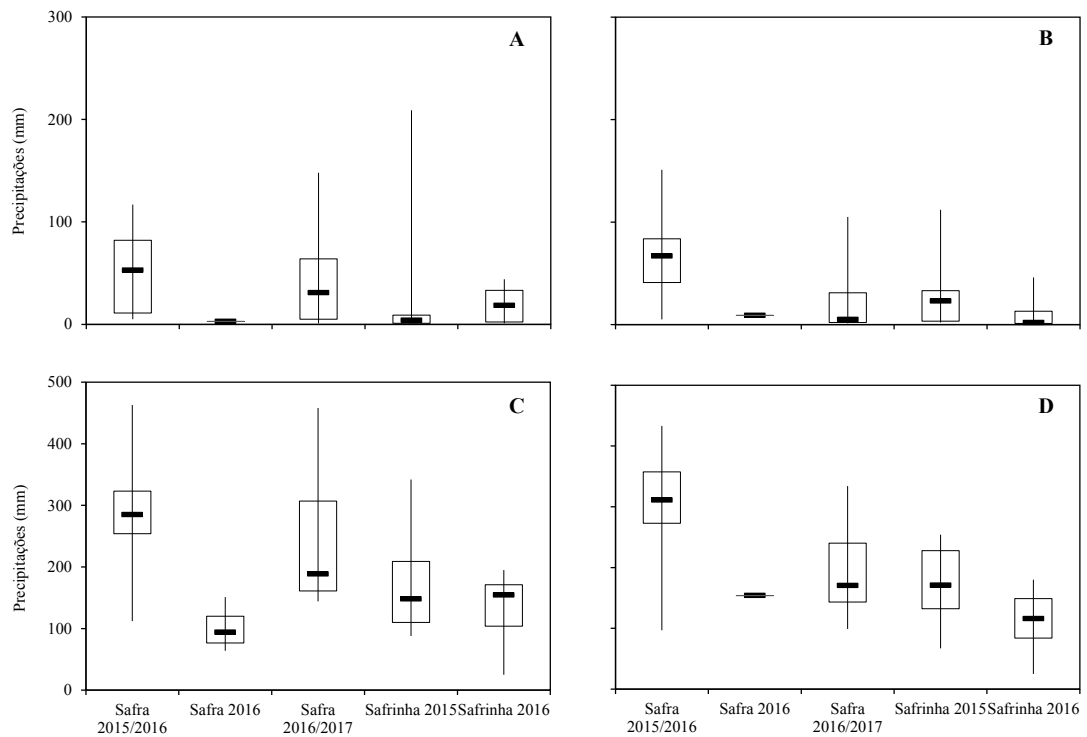


Figura 4. Precipitações (mm) registradas nas diferentes épocas de safra e safrinha de milho nos locais onde foram coletadas amostras com teor de fumonisina inferiores ao LQ (<125 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (A e C) e superior ao LMT (5000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (B e D) para o mês que antecede a colheita (A e B) e florescimento da cultura (C e D). Informações processadas de um total de 989 amostras.

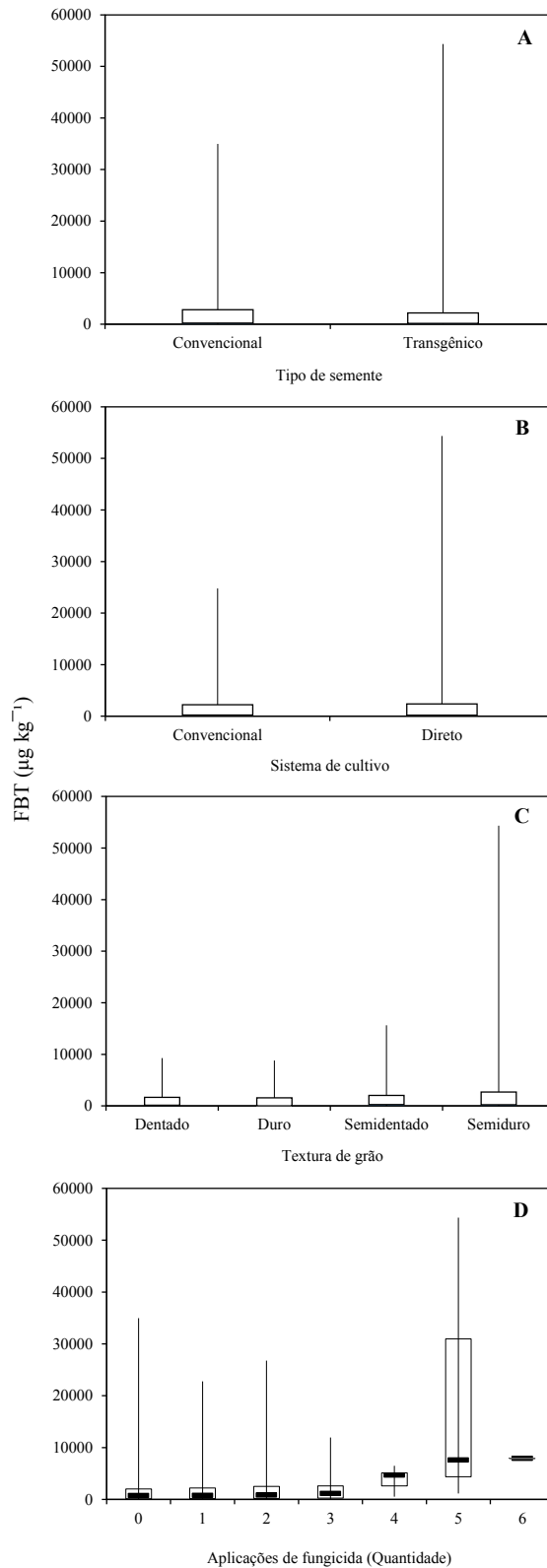


Figura 5. Distribuição dos valores de Fumonisinhas Totais em grãos de milho em relação ao tipo de semente utilizada pelos produtores (A), textura dos grão (B), sistema de cultivo (C) e número de aplicações de fungicida (D).

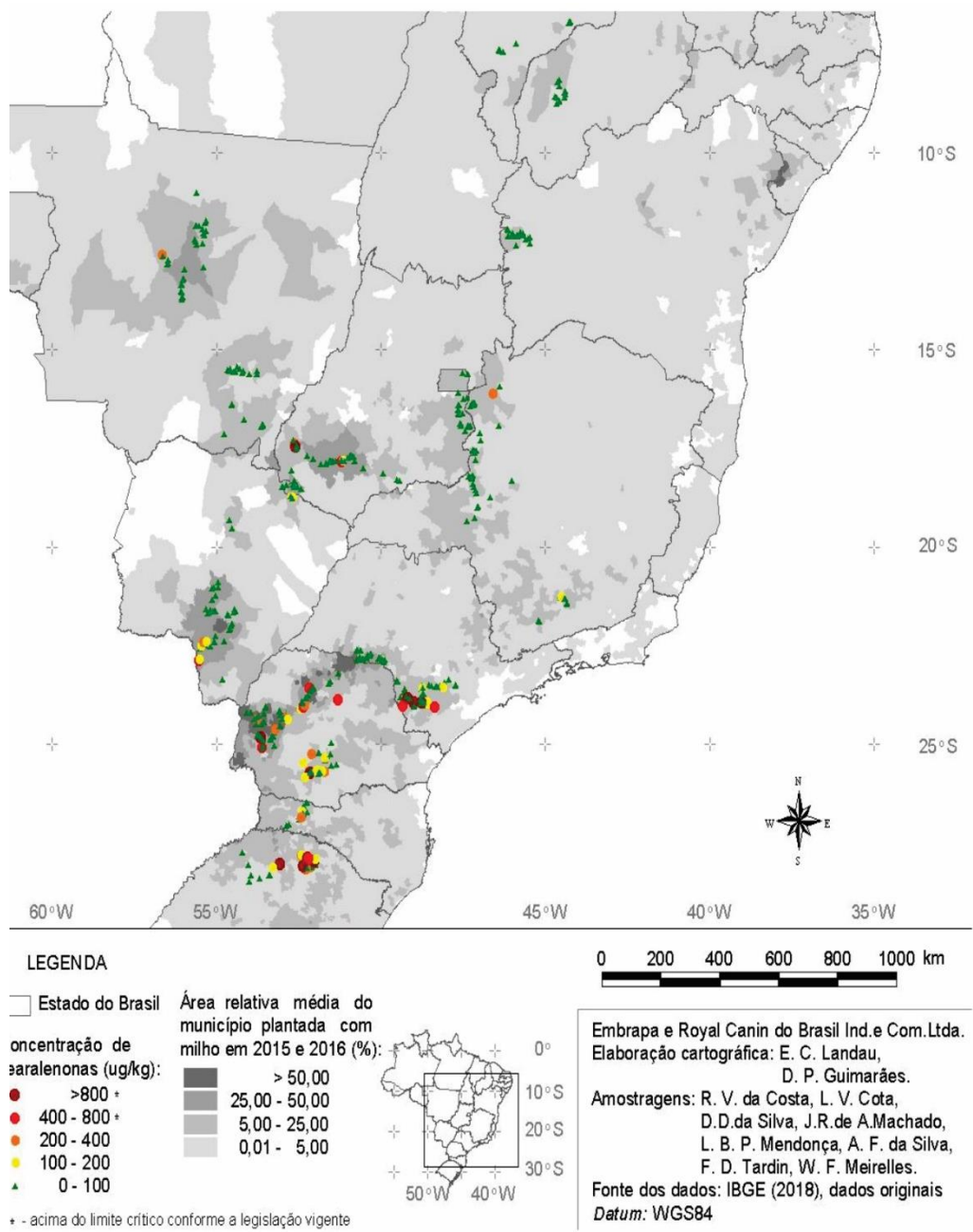


Figura 6. Ocorrência de zearalenona no Brasil de janeiro de 2015 a julho de 2017.

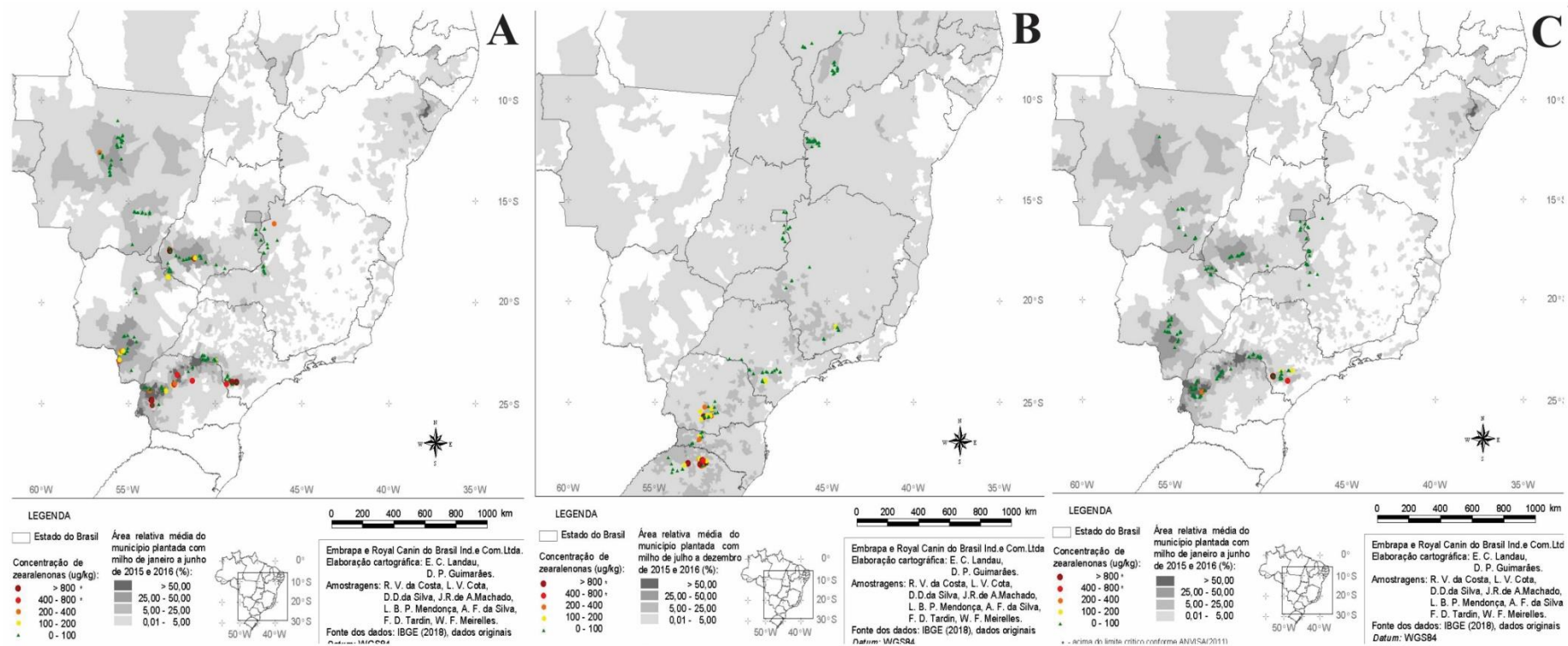


Figura 7. Ocorrência de zearalenona no Brasil por época de plantio. A) Safrinha 2015. B) Safra 2015/2016. C) Safrinha 2016.

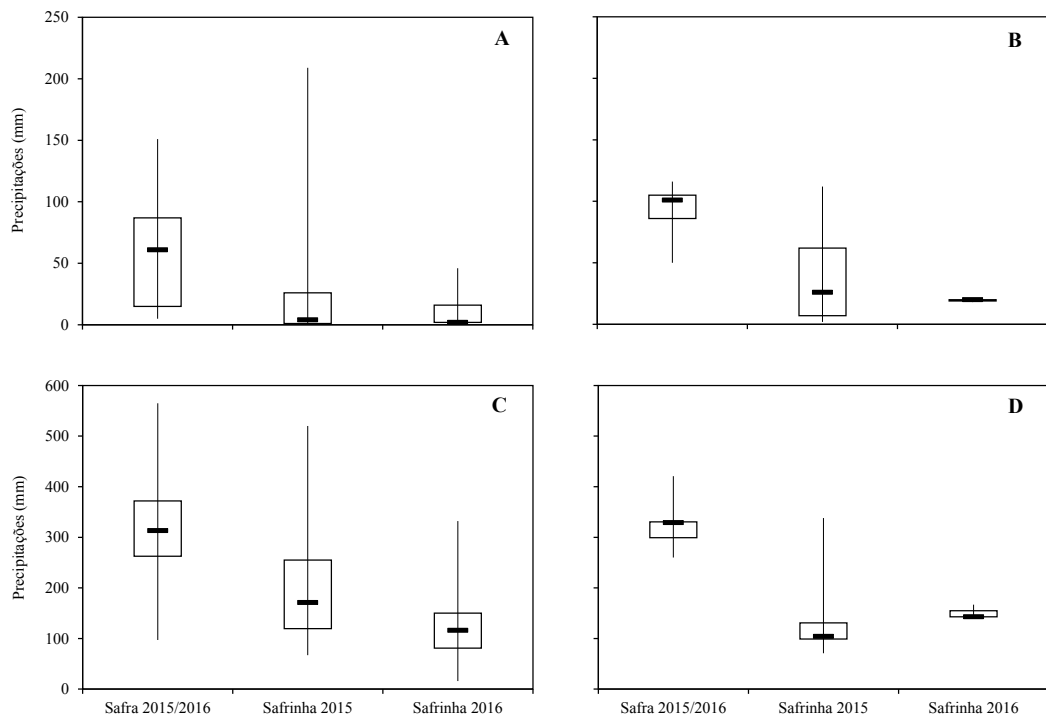


Figura 8. Precipitações (mm) registradas nas diferentes épocas de safra e safrinha de milho nos locais onde foram coletadas amostras com teor de zearalenona inferiores ao LQ ($<20 \mu\text{g kg}^{-1}$) (A e C) e superior ao LMT ($400 \mu\text{g kg}^{-1}$) (B e D) para o mês que antecede a colheita (A e B) e florescimento da cultura (C e D).

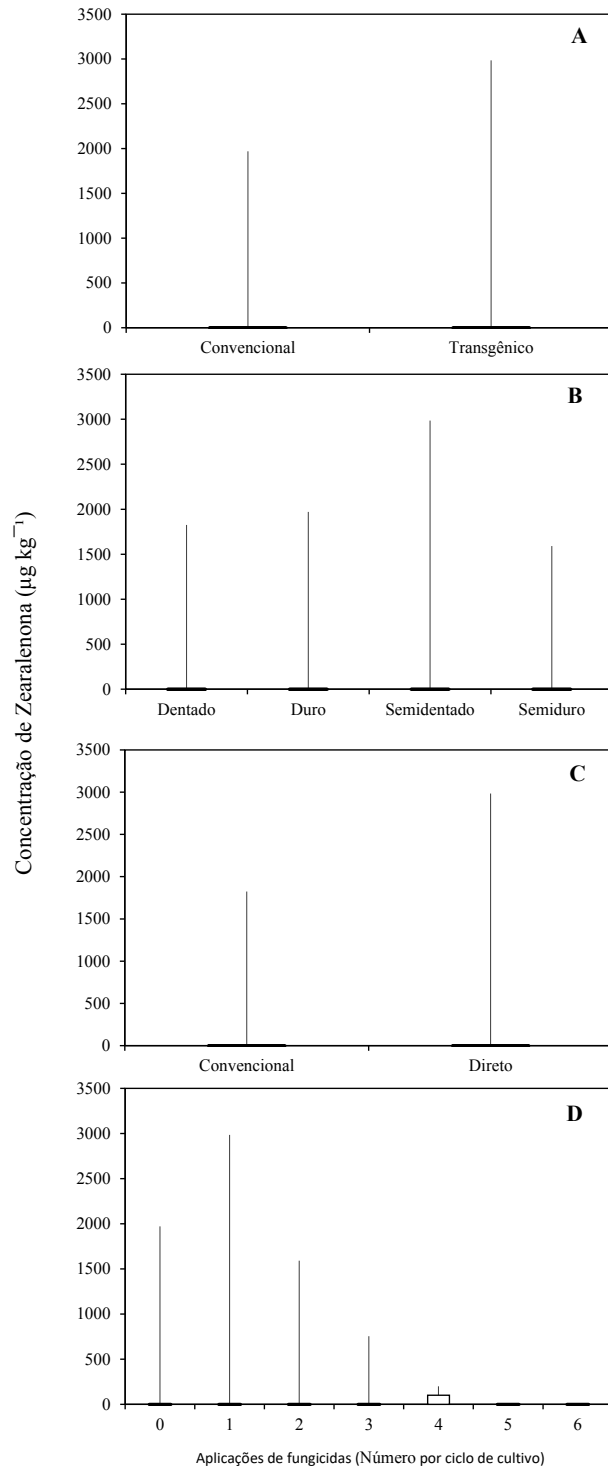


Figura 9. Distribuição dos valores de zearalenona em grãos de milho em relação ao tipo de semente utilizada pelos produtores (A), textura dos grão (B), sistema de cultivo (C) e número de aplicações de fungicida (D).

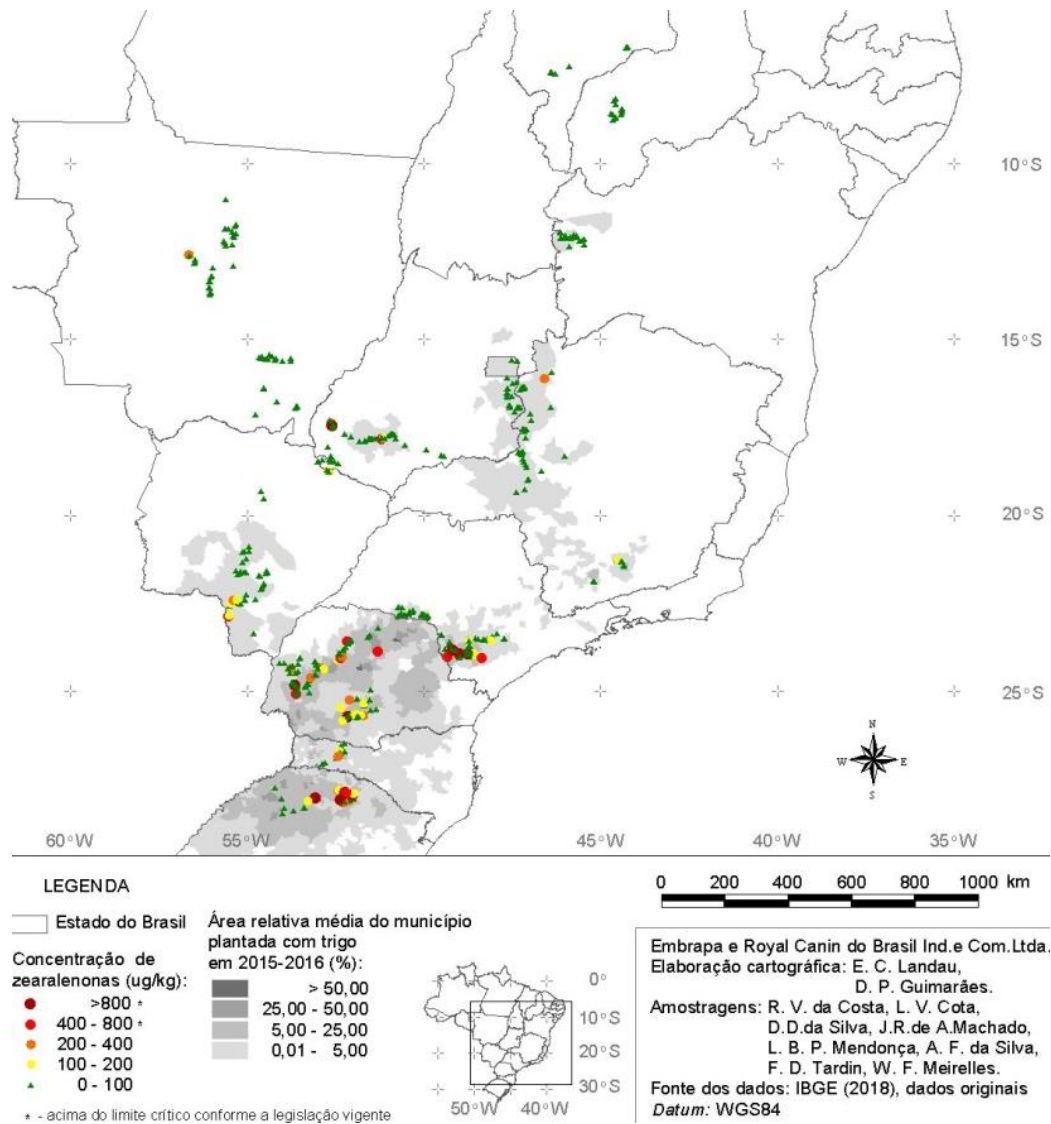


Figura 10. Ocorrência de zearalenona em grãos de milho no Brasil no período de janeiro de 2015 a julho de 2017 comparada à área de cultivo do trigo.

ARTIGO 2

Ocorrência de fungos, grãos ardidos, fumonisinas e zearalenona associados ao milho no brasil

RESUMO

A incidência de grãos ardidos afeta o rendimento e a qualidade dos grãos de milho, não só devido a alterações fisiológicas, mas também pela ocorrência de micotoxinas. Neste trabalho, foram determinados os percentuais de grãos ardidos, a incidência de fungos associados aos grãos e os teores de fumonisinas e zearalenona em 591 amostras de milho coletadas em 12 estados do Brasil, durante a safrinhas de 2015, a safra de 2015/16 e safrinha de 2016. Somente 11,84% das amostras não apresentaram incidência de grãos ardidos. Entre as amostras positivas para grãos ardidos, 89,44% estavam abaixo do limite tolerado pela indústria, 6%. Ao classificar os grãos em tipos, de acordo com a legislação em vigor, a incidência de grãos ardidos na safra 2015/16 apresentou perfil diferente do encontrado nas duas safrinhas. Nas safrinhas de 2015 e 2016 encontrou-se comportamento muito similar quanto à incidência de grãos ardidos, o percentual de grãos ardidos por extrato em cada época não variou mais do que 0,93% e em média 95% das amostras apresentaram incidência inferior a 6% de grãos ardidos. Na safra 2015/16 nos extratos tipo 1, tipo2, tipo 3 e fora de tipo foram classificadas, respectivamente, 81,91%, 5,48%, 4,52% e 2,25% das amostras. Pela análise de sanidade dos grãos identificou-se os gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus* como os três principais. Quanto à incidência relativa, os gêneros *Fusarium* e *Penicillium* foram os mais importantes. Nas análises de *cluster*, realizadas separadamente para fumonisinas e zearalenona, foram obtidos 4 *clusters* a 55% de similaridade. Em ambos os casos observou-se que a ocorrência de micotoxina está correlacionada à incidência do patógeno em grãos ardidos, porém não tem correlação direta com o percentual de grãos ardidos na amostra. Também não apresentou relação com os dados de precipitação. A análise de *cluster* mostrou ainda a correlação entre o peso de 1000 grãos e o local de plantio e entre precipitação e incidência de grãos ardidos. Conclui-se que o milho brasileiro apresenta boa qualidade em relação ao percentual de grãos ardidos e teores de fumonisina e zearalenona.

Palavras chave: grãos ardidos; *Fusarium* spp.; micotoxinas; fumonisinas; zearalenona.

ABSTRACT

The incidence of burned grains affects the yield and quality of corn grains, not only due to physiological changes, but also due to the incidence of mycotoxins. In this work, the percentages of burned grains, the incidence of fungi associated with grains and the levels of fumonisins and zearalenone were determined in 591 maize samples collected in 12 Brazilian states, during the safrinhas of 2015, the harvest of 2015/16 and only 11.84% of the samples had no incidence of burned grains. Entre as amostras positivas para grãos ardidos, 89,44% estavam abaixo do limite tolerado pela indústria, 6%. Ao classificar os grãos em tipos, de acordo com a legislação em vigor, a incidência de grãos ardidos na safra 2015/16 apresentou perfil diferente do encontrado nas duas safrinhas. In the safrinhas of 2015 and 2016 was very similar behavior regarding the incidence of burned grains, the percentage of grains burnt per extract in each season did not vary more than 0.93% and on average 95% of the samples presented incidence less than 6 % of burned grains. In the 2015/16 harvest, 81.91%, 5.48%, 4.52% and 2.25% of the samples were classified in the extracts type 1, type 2, type 3 and out of type. Pela análise de sanidade dos grãos identificou-se os gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus* como os três principais. Quanto à incidência relativa, os gêneros *Fusarium* e *Penicillium* foram os mais importantes. In the cluster analyzes, performed separately for fumonisins and zearalenone, 4 clusters were obtained at 55% of similarity. In both cases it was observed that the occurrence of mycotoxin is correlated to the incidence of the pathogen in burned grains, but it does not have direct correlation with the percentage of grains burned in the sample. Também não apresentou relação com os dados de precipitação. A análise de *cluster* mostrou ainda a correlação entre o peso de 1000 grãos e o local de plantio e entre precipitação e incidência de grãos ardidos. Conclui-se que o milho brasileiro apresenta boa qualidade em relação ao percentual de grãos ardidos e teores de fumonisina e zearalenona.

Keywords: burned grains; *Fusarium* spp; mycotoxins; fumonisins; zearalenone.

1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de doenças é um dos fatores que limitam ou até mesmo inviabilizam a produção de milho (Pereira, 1997). Dentre as principais doenças, além das foliares, citam-se as podridões de colmo e espiga que, via de regra, são causadas pelo mesmo grupo de patógenos (Reis *et al.*, 2004). No Brasil, as principais espécies de fungos causadores de podridão em espigas são *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora*, que ocasionam a podridão branca da espiga, e espécies do gênero *Fusarium*, *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* e *F. proliferatum*, agentes causais da podridão rosada. Com menor frequência, as podridões também podem ser causadas por *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. (Casela *et al.*, 2006).

A infecção das espigas pode acontecer em pré ou pós-colheita. No campo, a infecção pode ocorrer através do estigma, quando o esporo do patógeno germina e desenvolve seu tubo germinativo até atingir o ovário; através de penetração direta na base ou na ponta da espiga; e sistemicamente no período de formação da espiga e dos grãos através da planta mãe (Reis *et al.*, 2004). Em pós-colheita, as infecções acontecem quando as condições ambientais (temperatura, umidade, concentração de CO₂ e O₂) são favoráveis e associadas principalmente a danos mecânicos ou injúrias ocasionadas por insetos (Magan *et al.*, 2003). Os grãos afetados apresentam descoloração e, como resultado do processo de fermentação realizado pelo fungo, sua coloração pode variar de marrom claro a roxo, ou de vermelho claro a intenso (Athié *et al.*, 1998; Reis *et al.*, 2004; Pinto, 2005). Os grãos que apresentam descoloração em ao menos um quarto de sua superfície, são definidos como grãos ardidos (Pinto, 2005; BRASIL, 2011a).

Atualmente, o Brasil dispõe de legislação específica para o percentual de grãos ardidos presentes no lote (BRASIL, 2011a) e para os teores admissíveis para as principais micotoxinas (BRASIL, 2011b; BRASIL, 2017). Quanto a tolerância para grãos ardidos, o milho pode ser classificado como Tipo 1, Tipo 2 e Tipo 3, que respectivamente, admitem 6%, 10% e 15% de grãos ardidos (BRASIL, 2011a). Acima de 20%, o lote é considerado desclassificado ou Fora de Tipo. Todavia, como padrão de qualidade, muitas indústrias não admitem lotes que não pertençam a classificação Tipo 1, ou seja, lotes com percentual de grãos ardidos superiores a 6% são rejeitados (EMBRAPA, 2007).

Um fator muito importante relacionado com os fungos nos grãos é a contaminação por micotoxinas, metabólitos secundários tóxicos à saúde humana e animal (Santos *et al.*, 2002), sendo que as espécies de patógenos associadas às podridões de espiga podem ser classificadas em micotoxigênicas (Pinto, 2005). A incidência de fungos toxigênicos afeta todos os segmentos da cadeia produtiva, desde a redução na produtividade no campo até a comercialização, pois o teor de micotoxinas é uma importante barreira fitossanitária para exportação de grãos (Figueira *et al.*, 2003).

Entre os principais fungos produtores de micotoxinas, os gêneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Alternaria* destacam-se (Pitt & Miller, 2016; Freyman *et al.*, 2017). No Brasil, os gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* prevalecem em grãos de milho. Em todos os levantamentos, o gênero *Fusarium* apresenta maior incidência no milho brasileiro, caracterizando-se como o principal patógeno em grãos dessa cultura (Pozzi *et al.*, 1995; Orsi *et al.*, 2000; Bento *et al.*, 2012; Catão *et al.*, 2013; Valmorbidia *et al.*, 2018).

Dentre as espécies de *Fusarium* há uma diferença quanto ao tipo de micotoxina produzida. *F. graminearum* e *F. culmorum* produzem zearalenona e os principais tricotecenos, enquanto que *F. verticillioides* e *F. proliferatum* produzem fumonisinas em elevada quantidade (Parry *et al.*, 1995; Miller, 2008). *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* são frequentemente associadas a podridões em grãos de milho e o dano mais expressivo é, em inúmeras vezes, a redução na qualidade de grãos e sementes devido à produção de micotoxinas (Munkvold & Desjardins, 1997; Figueira *et al.*, 2003).

A zearalenona mimetiza o estrogênio, um hormônio reprodutivo feminino (Bennet & Klinch, 2003), em animais os sintomas mais comuns de intoxicação são inflamação dos órgãos sexuais em fêmeas e atrofia em machos, infertilidade e perda de peso (Soldati, 2010). Em seres humanos, além de alterações hormonais também são observados efeitos hepatotóxicos, modificação em parâmetros hematológicos e imunológicos, morte celular, inibição da síntese de DNA e proteínas e peroxidação de lipídios (Gao *et al.*, 2013). Por sua vez, as fumonisinas estão relacionadas a diversos tipos de danos à saúde animal, edemas pulmonares, problemas cardiovasculares e alterações fisiológicas em suínos; perda de peso e score corporal em aves; leucoencefalomacia (LEM) em equinos; câncer em fígado e rins em ratos (Howard *et al.*, 2001; Figueira *et al.*, 2003; Stockmann-Juvala & Savolaine, 2008). Em seres

humanos estudos epidemiológicos em diversos países do mundo, inclusive no Brasil, demonstraram existir uma correlação positiva entre fumonisinas e câncer de esôfago. Há ainda relatos de efeitos teratogênicos em algumas regiões africanas e na fronteira entre Estados Unidos e México (Figueira *et al.*, 2003; Stockmann-Juvala & Savolaine, 2008).

Até o momento, todos os trabalhos realizados apontaram *Fusarium verticillioides* como a espécie causadora de podridão de espigas predominante no Brasil, todavia estas pesquisas contemplaram uma quantidade limitada de amostras e regiões amostradas (Pozzi *et al.*, 1995; Orsi *et al.*, 2000; Bento *et al.*, 2012; Catão *et al.*, 2013; Stumpf *et al.*, 2013; Lanza *et al.* 2014; Valmorbidia *et al.*, 2018). Este trabalho teve por objetivo determinar os percentuais de grãos ardidos, fungos associados a grãos e os teores de fumonisina e zearalenona em amostras de milho coletadas nas principais regiões produtoras do Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Fitopatologia e Sanidade de grãos da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, em uma parceria público-privada entre a EMBRAPA e Mars Brasil. Foram analisadas 591 amostras de grãos de milho obtidas em 12 estados nas safrinhas de 2015 (190 amostras), safrinha de 2016 (202 amostras) e na safra 2015/16 (199 amostras).

A escolha dos locais de amostragem foi realizada de acordo com a distribuição da produção de milho no Brasil na primeira e segunda safra. Nas safrinhas, as amostras foram coletadas em Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul; e na safra, na região oeste da Bahia, Maranhão, Piauí, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná, Goiás, Santa Catarina, São Paulo e Distrito Federal.

As amostras foram obtidas sob condições de campo de duas maneiras: i) amostras de grãos; ii) amostras de espigas. No momento da colheita foram retiradas no mínimo cinco subamostras em diferentes pontos dos caminhões. As amostras simples foram homogeneizadas e uma amostra composta de 1 kg de grãos foi subtraída. As coletas de grãos foram realizadas somente quando havia a certeza de que apenas um híbrido seria colhido no talhão. A amostragem de espigas se deu em ocasiões em que a visita à propriedade não coincidiu com o momento da colheita ou não se podia afirmar que o milho no caminhão pertencia a um único híbrido. As

espigas, após a maturação fisiológica, foram coletadas de forma aleatória. O procedimento padrão adotado nessas circunstâncias estabeleceu uma distância mínima de segurança de 50 m entre a bordadura dos talhões e os pontos de amostragem de espigas. Evitando-se a coleta em áreas sujeitas a interferência externas e buscando-se maior representatividade da área em questão. Em cada ponto, foram coletadas, no mínimo 30 espigas por amostra. Após as coletas, as espigas foram debulhadas, os grãos homogeneizados e uma amostra final de 1 kg foi retirada.

As amostras obtidas foram encaminhadas à Embrapa Milho e Sorgo e, quando necessário, submetidas à secagem até atingir 13% de umidade. Em seguida, os grãos foram novamente homogeneizados e separados em subamostras de 0,5 kg. Uma subamostra foi encaminhada aos Laboratórios de Fitopatologia e Sanidade de Grãos enquanto a outra amostra foi encaminhada a um laboratório especializado para determinação dos teores de fumonisinas e zearalenona. As amostras foram acondicionadas em freezer a -20 °C até o momento da avaliação.

Com um GPS, foram registradas as coordenadas geográficas de localização (latitude e longitude) de cada ponto de coleta para posterior correlação dos teores de fumonisinas e zearalenona e da incidência de fungos com os dados climáticos em nível local. Além disso, no momento da coleta de amostras levantadas informações referentes a data de plantio.

2.1 Determinação do percentual de grãos ardidos

A primeira variável determinada foi o peso de 1000 grãos, utilizando-se para isso a metodologia preconizada pelas Regras Para Análise de Sementes (MAPA, 2009). Mensurou-se a umidade e a massa total de cada amostra e, na sequência, foram separadas oito repetições de 100 grãos (selecionados ao acaso, não havendo distinção entre grãos sadios e ardidos), cuja massa foi expressa em gramas. Calculou-se a média das oito repetições e o valor obtido foi multiplicado por 10 para obter o peso de 1000 grãos.

A incidência de grãos ardidos foi feita pela separação visual de todos os grãos que apresentaram descoloração em no mínimo 25% de sua superfície (matiz variando de marrom claro a roxo ou, de vermelho-claro a vermelho-intenso), de acordo com os critérios estabelecidos pela legislação (BRASIL, 2011a). Após a determinação da

massa em gramas de grãos ardidos presente em cada amostra, determinou-se o percentual em função da massa total da amostra inicial.

2.2 Análise de patologia de grãos

Para análise de patologia, foi determinada a incidência de fungos em dois extratos diferentes: grãos ardidos e assintomáticos. Em amostras onde o número de grãos ardidos foi inferior a cem grãos, todos os grãos foram analisados e, nas amostras com valores acima, 100 grãos ardidos foram analisados. Para cada extrato foram avaliados 100 grãos aparentemente sadios que foram distribuídos em (quatro repetições com 25 grãos cada).

A metodologia utilizada foi a incubação em papel de filtro com congelamento (*Blotter Test*) (MAPA, 2009). Os grãos foram desinfestados com hipoclorito de sódio a 2% por 5 min e distribuídos em caixa gerbox contendo duas folhas de papel mata borrão estéril e embebido em ágar-ágar a 0,5%. As caixas foram mantidas sob luz contínua e temperatura ambiente por 24h (para estimular o início do processo germinativo). Após esse período, as caixas foram incubadas a -20 °C por 24h (para inibir a germinação e evitar a contaminação cruzada entre os grãos). Por fim, o material foi transferido para câmaras de crescimento sob temperatura constante de 25 °C e fotoperíodo de 12h por 10 dias. Após esse período, os grãos foram avaliados individualmente com microscópio estereoscópico para identificação de *Fusarium* spp. (Complexo *Giberella fujikuroi*) e *Fusarium graminearum*, além da quantificação dos demais gêneros fúngicos presentes na amostra.

2.3 Análise de micotoxinas

As análises de fumonisinas (totais) da safrinha 2015 foram realizadas no Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC), da Universidade Federal de Santa Maria (RS). As demais análises foram realizadas no laboratório Soluções Analíticas Microbiológicas e Tecnológicas (SAMITEC) em Santa Maria, RS.

As análises foram realizadas por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS) como descrito por Oliveira *et al.* (2017). Os limites de quantificação (LQ) e os coeficientes de recuperação (%) para FB1 foram de 125 µg kg⁻¹ e 101% e para FB2 de 125 µg kg⁻¹ e 96%. As estimativas

de incerteza foram FB1 ($\pm 33,2 \mu\text{g kg}^{-1}$; $K=2,18$) e FB2 ($\pm 35,2 \mu\text{g kg}^{-1}$; $K=2,52$). Como a legislação brasileira (BRASIL, 2011) não considera as fumonisinas separadamente, os valores de FB1 e FB2 foram somados para obtenção do valor de fumonisinas totais (FBT). Assim, para as análises subsequentes deste trabalho foram utilizados os valores de FBT.

As análises de zearalenona foram realizadas nas amostras coletadas na safrinha 2015, safra 2015/16 e safrinha 2016. Neste caso também foi utilizada a metodologia LC-MS/MS descrita por Oliveira *et al.* (2017). O limite de detecção de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$, coeficiente de recuperação de 85% e, estimativa de incerteza de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($0,53 \mu\text{g kg}^{-1}$).

2.4 Obtenção de dados climáticos

Utilizou-se a base de dados CHIRPS - Climate Hazards Group InfraRed Precipitation with Station (<http://chg.geog.ucsb.edu/data/chirps/>) para fazer o levantamento do índice pluviométrico de cada ponto amostrado. Os dados foram agrupados em períodos de 10 dias (decêndios).

2.5 Análise dos dados

O cálculo de rendimento de grãos, percentual de grãos ardidos em função do peso total da amostra, incidência relativa de cada fungo e a confecção dos gráficos foram realizados no software Microsoft Excel.

As amostras foram classificadas de acordo com o percentual de grãos ardidos conforme estabelecido pela Instrução Normativa nº 60, de 22 de dezembro de 2011 (Brasil, 2011a) em tipo 1 (incidência $<6\%$), tipo 2 (incidência de grãos ardidos $<10\%$), tipo 3 (incidência de grãos ardidos $<15\%$), e fora de tipo (incidência de grãos ardidos $<20\%$). As amostras que não estavam dentro dos critérios da legislação compuseram uma quarta categoria (incidência acima de 20%).

Realizou-se uma análise multivariada (método de *clusters*) com o intuito de avaliar a relação entre os teores de micotoxinas, o percentual de grãos ardidos, precipitação, incidência relativa de *Fusarium spp.* e época de plantio. Através de procedimentos hierárquicos, o método forma agrupamentos entre variáveis correlacionadas. As análises de *cluster* foram feitas com Minitab® Statistical

Software, utilizando-se o método de ligação completo e similaridade de 55%. Para facilitar a interpretação dos dados, fumonisinas totais e zearalenona foram analisadas individualmente. Ao todo foram utilizadas 11 variáveis: época de plantio (safrinhas 2015 e 2016 e safra 2015/2016), porcentagem de *Fusarium* spp. ou *Fusarium graminearum* em grãos sadios; umidade nos grãos, em porcentagem; estado; rendimento (peso de 1000 grãos, em gramas); teor de fumonisinas totais ou teor de zearalenona expressos em $\mu\text{g}/\text{Kg}^{-1}$; porcentagem de *Fusarium* spp. ou *Fusarium graminearum* em grãos ardidos; precipitação (em mm) na floração; precipitação total (mm); precipitação no mês anterior à colheita, em; e percentual de grãos ardidos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Percentual de grãos ardidos

Entre as 591 amostras analisadas, somente 11,8% não apresentaram incidência de grãos ardidos. Das amostras positivas para presença de grãos ardidos, 89,4%; 5,66%; e 3,52% foram classificados respectivamente como tipo 1, tipo 2 e tipo 3. Oito amostras (1,35 %) apresentaram nível de incidência igual ou superior a 20% de grãos ardidos.

Ao analisar as épocas de cultivo quanto à ocorrência de grãos ardidos, verificou-se um comportamento similar entre as duas safrinhas. A porcentagem de grãos por extrato em cada época não varia mais do que 0,93%, sendo que em média 95% das amostras apresentaram incidência inferior a 6% de grãos ardidos. Nas amostras da safra, maiores valores foram observados para grãos classificados como tipo 2, tipo 3 e fora de tipo na ordem de 5,48%, 4,52% e 2,25% respectivamente (Figura 1).

3.2 Fungos associados a grãos de milho

A incidência de fungos associados ao milho foi avaliada separadamente em grãos ardidos e sadios. Para cada tipo foram encontrados perfis diferentes quanto à distribuição e às espécies. Foram encontrados 15 gêneros de fungos em grãos sadios: *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Stenocarpella*, *Chaetomium*, *Curvularia*, *Bipolaris*, *Rhizoctonia*, *Cladosporium*, *Phoma*, *Trichoderma*, *Nigrospora*, *Rhizopus*,

Alternaria e *Pestalotia*. Em grãos ardidos, à exceção do gênero *Pestalotia*, todos os gêneros também ocorreram.

Ao analisar individualmente a safra 2015/16 e as safrinhas de 2015 e de 2016, quanto à presença ou ausência nas amostras, observa-se que há diferenças não só na incidência de fungos nos grãos ardidos e sadios, mas também em cada período. Dentre os 15 gêneros de fungos encontrados foram selecionados aqueles que ocorreram em mais de 5% das amostras analisadas (Figura 1).

Em todos os cenários analisados houve três gêneros que se destacaram quanto à frequência em função do número total de amostras, *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*, respectivamente. Os gêneros *Fusarium* e *Penicillium* apareceram em um grupo maior de amostras, independente da variável (tipos de grão e épocas de amostragem). Para *Fusarium*, a ocorrência variou de 70,53% a 90,59% em grãos ardidos e de 98,2% a 100% em grãos sadios. A frequência de amostras contaminadas com *Penicillium* variou entre 30,53% a 62,31% na porção de grãos ardidos e de 80,53% a 83,42% de grãos sadios. A ocorrência de *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. em grãos sadios foi maior do que a observada em grãos ardidos para todas as épocas. *Aspergillus* foi o terceiro gênero a apresentar maior frequência em relação ao número de amostras (variando de 24,21% a 71,86%), exceto na safrinha de 2015, onde a terceira posição foi ocupada pelo gênero *Stenocarpella* (Figura 1).

Na literatura há referências de fungos com menor expressão ocorrendo em grãos de milho: *Nigrospora*, *Cladosporium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus* e *Curvularia* (White, 1999; Medić-Pap *et al.*, 2011; Bento *et al.*, 2012). Os resultados deste trabalho estão em sintonia com trabalhos realizados anteriormente em que os gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus* são os principais fungos associados a grãos de milho no Brasil, sendo que os trabalhos são unânimes em identificar *Fusarium* spp. como o mais importante em termos de ocorrência em milho (Pozzi *et al.*, 1995; Dilkin *et al.*, 2000; Orsi *et al.*, 2000; Almeida *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2009; Bento *et al.*, 2012; Catão *et al.*, 2013; Valmorbidia *et al.*, 2018). Por sua vez, *Aspergillus* e *Penicillium* ora ocupam a segunda, ora a terceira colocação. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Orsi *et al.* (2000) e Pozzi *et al.* (1995), onde *Penicillium* spp. apresentou maior incidência que *Aspergillus* spp.

Embora apareça em um grupo menor de amostras nas safrinhas de 2015 e na safra de 2015/16 (além de ter apresentado incidência inferior a 5% na safrinha de 2016), a presença de *Stenocarpella* spp. também deve ser destacada. *Stenocarpella* é

caracterizado como importante patógeno na cultura do milho, já que duas de suas espécies, *S. maydis* e *S. macrospora*, são causadoras de podridão branca da espiga.

Ao analisar a incidência relativa média (IRm), ou seja, a incidência de cada fungo em função do total de grãos ardidos ou sadios avaliados em média para cada safra, *Fusarium* e *Penicillium* destacam-se novamente. Por sua vez, *Aspergillus* apresenta valores de IRm menores (Tabela 3).

A frequência e a IRm de *Fusarium* são altas para grãos ardidos e sadios, resultados semelhantes aos obtidos por Bento *et al.* (2012). Isso se deve à natureza do patógeno que pode desenvolver diferentes tipos de associação com a planta. As infecções podem ser sintomáticas, quando o fungo cresce no espaço inter e intracelular; e assintomáticas, quando o crescimento só ocorre no espaço intercelular (Bacon *et al.*, 2008; Munkvold *et al.*, 1997). Em anos de infecções severas, em um mesmo campo pode haver espigas com diferentes tipos de sintoma, mesmo em híbridos geneticamente homogêneos (Presello *et al.*, 2007).

3.2.1 Determinação das espécies de *Fusarium* spp.

Diversas espécies de *Fusarium* podem estar associadas à incidência de grãos ardidos em milho, porém com maior frequência são encontradas as espécies *F. subglutinans*, *F. verticillioides* e *F. graminearum*. De acordo com o trabalho de Lanza *et al.* (2014) no Brasil, a espécie de maior incidência é *F. verticillioides*. Porém, devido à dificuldade em separar as espécies *Fusarium* de mesmo complexo utilizando somente caracteres morfológicos, são necessárias ferramentas adicionais como análises moleculares (Leslie & Summerell, 2008).

As espécies, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* pertencem ao complexo de espécies *Giberella fujikuroi*. Nos trabalhos realizados por Querales (2010) e Lanza *et al.* (2014) no Brasil, observou-se que isolados inicialmente classificados como *F. proliferatum* através de caracteres morfológicos, após análises gênicas mostraram-se pertencentes a espécie *F. verticillioides*.

Quando os isolados pertencem a complexos diferentes, é possível caracterizá-los com base em caracteres morfológicos como coloração, tipo de esporo, presença ou ausência de clamidósporo, dentre outros (Leslie & Summerell, 2008). Dessa forma, fungos do gênero *Fusarium* encontrados nas amostras foram determinados, com base em caracteres morfológicos (Leslie & Summerell, 2008), em *Fusarium* spp. (pertencentes ao complexo *G. fujikuroi*) e em *Fusarium graminearum*. 9,77% das amostras de grãos ardidos e 10,66% das amostras de grãos sadios foram consideradas positivas para incidência de *Fusarium graminearum*. Em todos os casos, as infecções foram mistas com *Fusarium* spp.

3.3 Análise de clusters

Em 591 amostras analisadas, 86,6% foram positivas para fumonisinas e 14,6% não se detectou a presença. No entanto, deve-se ressaltar que a não-detecção não garante a ausência de micotoxina, pois a metodologia utilizada tem um limite mínimo de quantificação (LQ), que para fumonisinas em LC-MS/MS é de 125 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Das amostras contaminadas, 87,32% apresentaram índice de contaminação inferior ao LMT de 5.000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ determinado pela ANVISA (BRASIL, 2017), 15,2% valores superiores ao LMT.

A análise de *cluster* contemplando 11 variáveis resultou no dendrograma da figura 4. Os dados foram agrupados em quatro *clusters*, através do método completo e considerando similaridade de 55%. Ao analisar os clusters isoladamente é possível entender melhor a correlação entre as variáveis. O primeiro cluster agrupou a época de cultivo, o percentual de *Fusarium* spp. no grão sadio com 65,82% de similaridade; já a umidade no grão relaciona-se a esses dois com 55,1%. Sendo assim, 65,82% da variação relacionada à incidência de *Fusarium* nos grãos está relacionada a época em que o milho foi cultivado. Essa associação está de acordo com os resultados observados anteriormente neste trabalho quanto a incidência relativa média e também com os resultados de Bento *et al.* (2012). A umidade no grão, por sua vez, influencia diretamente a incidência *Fusarium* spp. nos grãos, sendo que valores próximos a 20% são as mais adequadas (Leslie & Logrieco; 2014). Em média, os valores de umidade nos grãos foram de 13,82%, mas em 21% das amostras os teores variaram em 15 e 18%.

No segundo cluster visualiza-se similaridade de 58,31% entre os estados e o rendimento de grão. O milho é cultivado em todas as regiões brasileiras sob diversas condições climáticas e sistemas agronômicos, por isso em alguns locais são observadas produtividades muito superiores (Galvão *et al.*, 2015). Atualmente, 70% do milho do Brasil é produzido na safrinha, basicamente na região Centro-Oeste, embora o plantio na safrinha represente alto risco em função das variações climáticas (Cruz *et al.*, 2011; Galvão *et al.*, 2015). Os estados Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e o Distrito Federal produzem 68% do milho safrinha e detêm as maiores produtividades do país (CONAB, 2018) resultado do uso massivo de alta tecnologia (Galvão *et al.*, 2015). Já na primeira safra, a produção está concentrada nas regiões Sul e Sudeste devido às condições climáticas mais favoráveis ao desenvolvimento da cultura (Galvão *et al.*, 2015).

No terceiro cluster, a incidência de *Fusarium* spp. em grãos ardidos apresentou similaridade de 56% com os teores de fumonisinas totais. Os teores de fumonisinas totais apresentaram baixa similaridade (< 55%) com o percentual de grãos ardidos e com as precipitações na floração, no mês anterior à colheita ou total. Isso diverge com resultados de trabalhos realizados anteriormente, que mostraram maiores correlações entre períodos de seca antes da floração e de alta pluviosidade no mês que antecede a colheita (Ono *et al.*, 1999). A correlação de 60,3% entre as chuvas e a incidência de grãos ardidos (*cluster* 4) corrobora com a literatura, haja vista que as podridões de

espiga causadas por *Fusarium* spp., são encontradas em todas as regiões produtoras de milho no Brasil e ambas precisam de alta umidade para ocorrer (Cota *et al.*, 2015).

Em 591 amostras de grãos de milho, detectou-se zearalenona em 19,8%, das quais 22,2% encontravam-se acima de 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$, LMT determinado pela ANVISA (BRASIL, 2017). Um 80,2% das amostras estavam abaixo do LQ, que para zearalenona em LC-MS/MS é de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

A análise de *cluster* para zearalenona contemplou as seguintes variáveis: época de plantio (safrinhas 2015 e 2016 e safra 2015/2016), porcentagem de *Fusarium graminearum* em grãos sadios; umidade nos grãos, em porcentagem; estado; rendimento (peso de 1000 grãos, em gramas); teor de fumonisinas totais (somatório de FB1 e FB2), expresso em $\mu\text{g kg}^{-1}$; porcentagem de *Fusarium graminearum* em grãos sadios; precipitação na floração, em mm; precipitação total, em mm; precipitação no mês anterior à colheita, em; e percentual de grãos ardidos. A 55% de similaridade, também foram obtidos 4 *clusters*. Embora com algumas diferenças, observa-se que a ocorrência de zearalenona está correlacionada a incidência de *F. graminearum* em grãos ardidos à 55,91%, porém não tem similaridade maior ou igual à 55% em relação ao percentual de grãos ardidos na amostra, assim como se observado para *Fusarium* spp. e fumonisinas totais.

A biossíntese de micotoxinas ocorre tanto em campo quanto no armazenamento e pode estar relacionada a diferentes fatores (Lesllie & Summerell, 2008; Leslie & Longrieco, 2014). Dentre os fatores ambientais que podem favorecer a biossíntese está o estresse hídrico, principalmente na fase após colonização do tecido hospedeiro (Ono *et al.*, 1999; Marín *et al.*, 2004; Jurado *et al.*, 2008; Fanelli *et al.*, 2013), habilidade toxigênica de diferentes isolados do patógeno (Lanza *et al.*, 2014; Nelson *et al.*, 1991; Picot *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2011) e temperatura (Marin *et al.*, 2004; Jurado *et al.*, 2008; Fanelli *et al.*, 2013).

Neste trabalho foi analisada um grande número de amostras se comparado aos trabalhos de levantamento realizados anteriormente (Pozzi *et al.*, 1995; Orsi *et al.*, 2000; Bento *et al.*, 2012; Catão *et al.*, 2013; Stumpf *et al.*, 2013; Lanza *et al.* 2014; Valmorbidia *et al.*, 2018) sendo todas as principais regiões produtoras contempladas. Contudo, através do método utilizado não foi possível estabelecer uma relação clara entre os teores de fumonisinas e zearalenona e a precipitação. A grande variabilidade nos teores de micotoxinas mesmo em amostras de lotes muito similares (Coker *et al.*,

1995; Rensburg *et al.*, 2011; Escrivá *et al.*, 2017) torna muito difícil a obtenção de um modelo matemático que explique a variação de maneira eficiente (Del Ponte, 2004; Torelli *et al.*, 2012;).

4 CONCLUSÕES

Embora o número de amostras com grãos ardidos e micotoxinas seja elevado, o milho brasileiro pode ser considerado de boa qualidade, já que a maior parte das amostras está abaixo dos limites estabelecidos pela legislação quanto à contaminação por grãos ardidos, fumonisinas totais e zearalenona.

Os gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* foram os mais frequentes em grãos de milho nas regiões brasileiras amostradas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, A. P., Corrêa, B., Mallozzi, M. A. B., Sawazaki, E., Soares, L. M. V. 2000. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. *Brazilian Journal of Microbiology* 31:321-326.

Athié, I., Castro, M. F. P. M., Gomes, R. A. R., Valentini, S. R. T. 1998. Conservação de grãos. Campinas. Fundação Cargill. 236p.

Bacon, C. W., Glenn, A. E., Yates, I. E. 2008. *Fusarium verticillioides*: endophytic association with maize for reduce fumonisins accumulation. *Toxin Reviews* 27:411-446.

Bennett, J. W., Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review* 16:497-516.

Bento, L. F., Caneppele, M. A. B., Albuquerque, M. C. F., Kobayashi, L., Caneppele, C., Andrade, P. J. (2012). Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. *Instituto Adolfo Lutz* 71: 44-49.

BRASIL, 2011a. Instrução Normativa nº 60, de 22 de dezembro de 2011. Estabelece o Regulamento Técnico do Milho. *Diário Oficial [da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, n. 246, 23 dez. 2011. Seção 1, p. 3-5.*

BRASIL, 2001b. Resolução de Diretoria Colegiada – RDC Nº 07, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2968262/RDC_07_2011_COMP.pdf/af_e3f054-bc99-4e27-85c4-780b92e2b966> Acesso em 08/07/2018.

BRASIL, 2017. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 138, de 8 de fevereiro de 2017. Altera a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, que dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, para alterar os LMT da micotoxina deoxinivalenol (DON) em trigo e produtos de trigo prontos para oferta ao consumidor e os prazos para sua aplicação. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3219534/RDC_138_2017_.pdf/b36e60b0-5112-43dc-9142-932f502fc46b?version=1.0>. Acesso em 04/05/2017.

Casa, R. T., Reis, E. M., Zambolim, L. 2006. Doenças do milho causadas por fungos do gênero *Stenocarpella*. *Fitopatologia Brasileira*, 31:427-439.

Casela, C. R., Ferreira, A. S., Pinto, N. F. J. A. 2006. Doenças da cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo- Circular técnica 83. 14 p.

Catão, H. C. R. M., Magalhães, H. M., Sales, N. L. P., Brandão, J. D., Rocha, F. S. 2013. Incidência e viabilidade de sementes crioulas de milho naturalmente infestadas com fungos em pré e pós-armazenamento. *Ciência Rural* 43:764-770.

Cruz, J. C., Silva, G. H., Pereira Filho, I. A., Gontijo Neto, M. M., Magalhães, P. C. 2010. Caracterização do cultivo de milho safrinha de alta produtividade em 2008 e 2009. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo* 9:177-188.

Companhia Nacional de Abastecimento. Série histórica das safras – Milho 2ª safra. Brasília: Conab, 2018. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras?start=20>>.

Del Ponte, E. M., Fernandes, J. M. C., Pierobom, C. R., Bergstrom, G. C. 2004. Aspectos epidemiológicos e modelos de previsão. *Fitopatologia Brasileira* 29:587-605.

Embrapa Milho e Sorgo. Sistemas de Produção, 1. ISSN 1679-012 Versão Eletrônica - 3ª edição. Nov./2007. Cultivo do Milho. Disponível em <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio_sisal/arvore/CONT000fckl80cd02wx5eo0a2ndxy5w90bbu.html> Acesso em: 08/07/2018.

Dilkin, P., Mallmann, C. A., Santurio, J. M., Hickmann, J. L. 2000. Classificação Macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de aflatoxinas em híbridos de milho. *Ciência Rural* 30:137-141.

Figueira, E. L. Z., Coelho, A. R., Ono, E. Y. S., Hirooka, E. Y. 2003. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. *Ciências Agrárias* 24:359-378.

Fraeyman, S., Croubels, S., Devreese, M. and Antonissen, G., 2017. Emerging *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins: occurrence, toxicity and toxicokinetics. *Toxins* 9: 228.

Gao, F., Jiang, L. P., Chen, M., Geng, C. Y., Yang, G., Ji, F., Zhong, L. F., Liu, X. F. 2013. Genotoxic effects induced by zearalenone in a human embryonic kidney cell

line. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 755:6-10.

Galvão, J. C. C., Trogello, E., Pereira, L. P. L. 2015. Milho Segunda Safra. Em: Borém, A.; Galvão, J. C. C.; Pimentel, M. A. Milho: do plantio a colheita. Editora UFV, Viçosa, 2015.

Lanza, F. B., Zambolim, L., Costa, R. V., Queiroz, V. A. V., Cota, L. V., Silva, D. D., Souza, A. G. C., Figueiredo, J. E. F. 2014. Prevalence of fumonisin-producing *Fusarium* species in Brazilian corn grains. Crop Protection 65:232-237.

Leslie, F. F., Logrieco, A. 2014. Micotoxins reduction in grains chains. Wiley-Blackwell, USA, 376p.

Leslie, J. F., Summerell, B. A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. 1. ed. USA: Blackwell Publishing. 388p.

Magan, N., Hope, R., Cairns, V., Aldred, D. 2003. Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. European Journal Plant Pathology 109:723-730.

Marques, O. J., Vidigal Filho, P. S., Dalpasquale, V. A., Scapim, C. A., Pricinotto, L. F., Machinski Júnior, M. 2009. Incidência fúngica e contaminações por micotoxinas em grãos de híbridos comerciais de milho em função da umidade de colheita. Acta Scientiarum. Agronomy, 31:667-675.

Maširević, S., Medić-Pap, S., Birvalski, S. 2012. Mycoflora of maize seed in 2010. Research Journal of Agricultural Science 44:1-6.

Miller, J. D. 2008. Mycotoxins in small grains and maize: old problems, new challenges. Food Additives and Contaminants 25:219-230.

Munkvold, G. P., Desjardins, A. E. 1997. Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence? Plant Disease: 81:556-565.

Munkvold, G. P., McGee, D. C., Carlton, W. M. 1997. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. Phytopathology 87: 209-217.

Querales, P. J. 2010. Caracterização morfológica e genética de *Fusarium* spp. isolados de sementes e associados à podridão do colmo do milho (*Zea mays*. L.). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Santos, P. G., Juliatti, F. C., Buiatti, A. L., Hamawaki, O. T. 2002. Avaliação do desempenho agrônomo de híbridos de milho em Uberlândia, MG. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 37:597-602.

Soldati, R. C. 2010. Micotoxinas em alimentos vegetais. Ixtlan, Viçosa. 120p.

Stockmann-Juvala, H., Savolaine, K. 2008. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. Human & Experimental toxicology 27:799-809.

Stumpf, R., Santos, J., Gomes, L. B., Silva, C. N., Tessmann, D. J., Ferreira, F. D., Machinski Junior, M., Del Ponte, E. M. 2013. Fusarium species and fumonisins associated with maize kernels produced in Rio Grande do Sul State for the 2008/09 and 2009/10 growing seasons. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44:89-95.

Reis, M. E., Casa, R. T., Bresolin, A. C. R. 2004. Manual de diagnose e controle de doenças do milho, 2 ed., Lages, Graphel, 144p.

Oliveira, M. S., Rocha, A., Sulyok, M., Krska, R., Mallmann, C. A. 2016. Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region of Brazil. *Food Control* 73:127-132.

Orsi, R. B., Corrêa, B., Possi, C. R., Schammass, E. A., Nogueira, J. R., Dias, S. M. C., Malozzi, M, A. B. 2000. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. *Journal of Stored Products Research* 36:75-87.

Parry, D. W., Jenkinson, P., McLeod, L. 1995. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals—a review. *Plant pathology*. 44:207-238.

Pereira, O. A. P. 1997. Doenças Do Milho (*Zea mays* L.) Em: Kimati, H., Amorim, L., Bergamim Filho, A., Camargo, L. E. A., Rezende, J. A. M. Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas, vol. 2, Ed. Agronômica Ceres, São Paulo, pp 500-515.

Pinto, N. F. J. A. 2005. Grãos ardidos em milho. Embrapa Milho e Sorgo, Circular técnica, 66. 6p.

Pitt, J. I.; Miller, J. D. 2016. A concise history of mycotoxin research. *Journal of agricultural and food chemistry* 65:7021-7033.

Pozzi, C. R., Corrêa, B., Gambale, W., Paula, C. R., Chacon-Reche, N. O., Meirelles, M. C. A. 1995. Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxin occurrence. *Food Additives & Contaminants* 12:313-319.

Presello, D. A., Iglesias, J., Botta, G., Eyhéabide, G. H. 2007. Severity of *Fusarium* ear rot and concentration of fumonisin in grain of Argentinian maize hybrids. *Crop Protection* 26:852-855.

Valmorbida, R., Savi, G. D., Silva, J. R., Yanez, M. M. O., Soares, C. E. S., Runtzel, C., Nascimento, P. N., Scussel, V. M. 2018. Quality and safety of maize (*Zea mays* L.) from Rondônia state storage units, Northern Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part B* 11:54-63.

White, D. G. (Ed.). Compendium of corn diseases. St. Paul, MN: APS press, 1999.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 – Incidência relativa média (IRm) por época de cultivo dos três gêneros de maior ocorrência em função do número total de amostras em grãos ardidos (GAR) e assintomáticos (GAS)

Época	<i>Fusarium</i> spp.		<i>Penicillium</i> spp.		<i>Aspergillus</i> spp.	
	GAR	GAS	GAR	GAS	GAR	GAS
Safrinha 2015	65,58%	78,82%	11,03%	10,37%	0,33%	0,91%
Safra 2015/16	64,34%	60,72%	14,74%	15,80%	10,67%	7,60%
Safrinha 2016	84,85%	84,82%	9,01%	10,38%	1,86%	5,61%

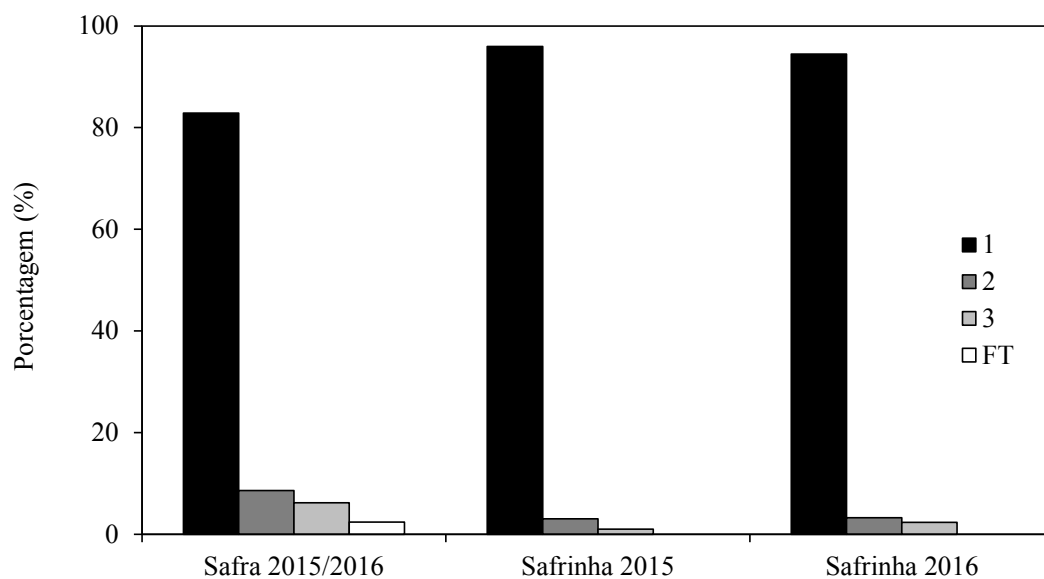


Figura 1. Classificação das amostras de milho quanto ao percentual de grãos ardidos nas safrinhas de 2015 e 2016 e na safra de 2015/2016 nas principais regiões produtoras do Brasil. Classificação em função do percentual de grãos ardidos: Tipo 1: < 6%; Tipo 2: <10%; Tipo 3: <15%; Fora de tipo: <20%.

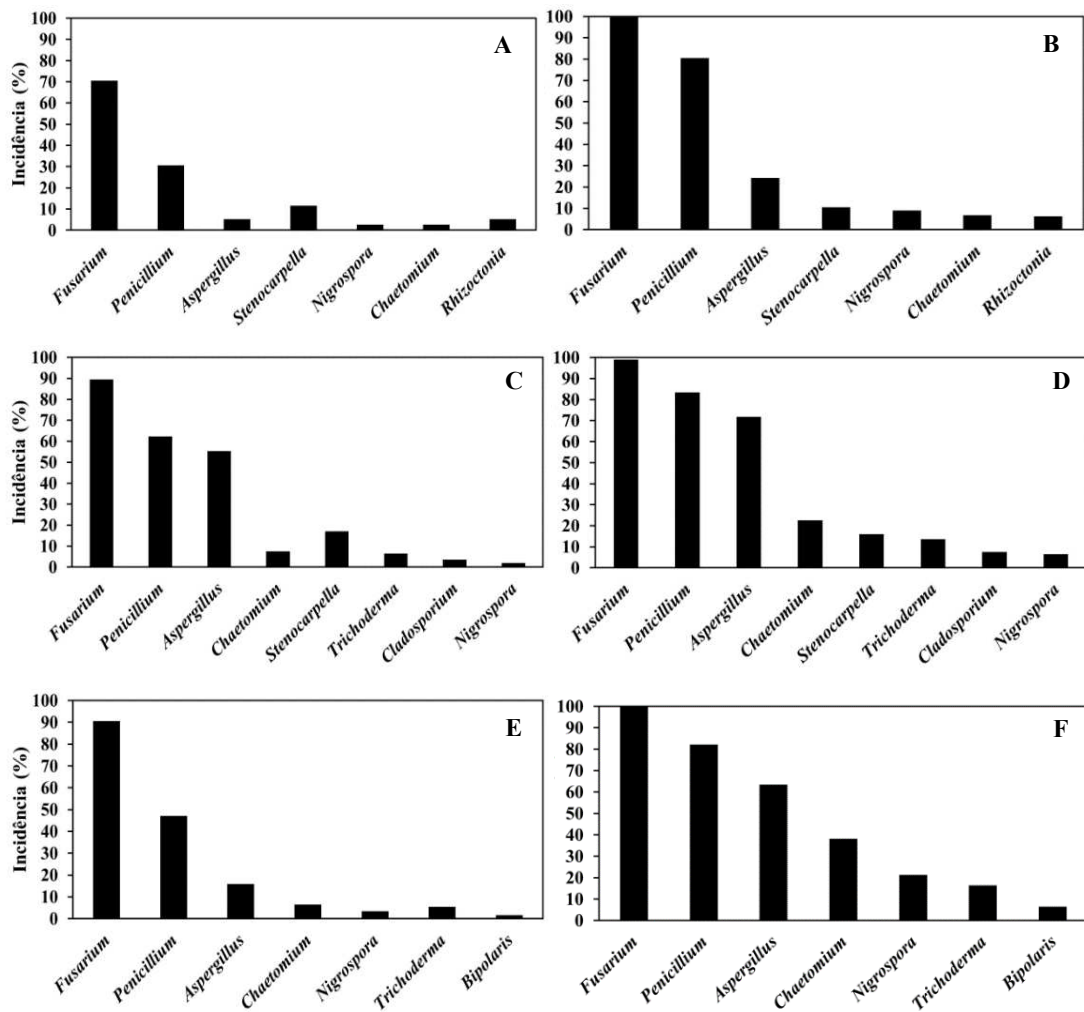


Figura 2. Incidência de fungos associados a grãos ardidos e sadios em amostras de milho obtidas nas principais regiões produtoras do Brasil na safra de 2015 e de 2016 e na safra de 2015/16.

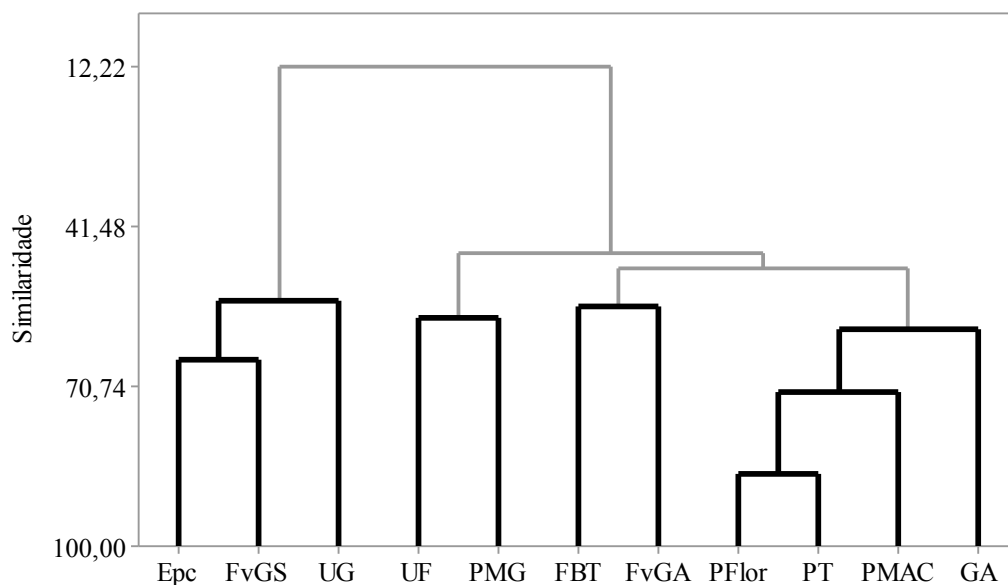


Figura 3. Dendrograma: Análise de *cluster* pelo método completo à 55% de similaridade. Variáveis: Época de plantio (Epc), safrinha 2015 e 2016 e safra 2015/2016; Porcentagem de *Fusarium* spp. em grãos sadios (FvGS); umidade nos grãos (UG), em porcentagem; estado (UF); rendimento, dado por peso de 1000 grãos em gramas (PMG); teor de fumonisinas totais, somatório de FB1 e FB2 (FBT) expresso em $\mu\text{g/Kg-1}$; Porcentagem de *Fusarium* spp. em grãos sadios (FvGA); precipitação na floração (PFlor), mm; Precipitação total (PT), mm; Precipitação no mês anterior à colheita (PMAC), mm; percentual de grãos ardidos (GA).

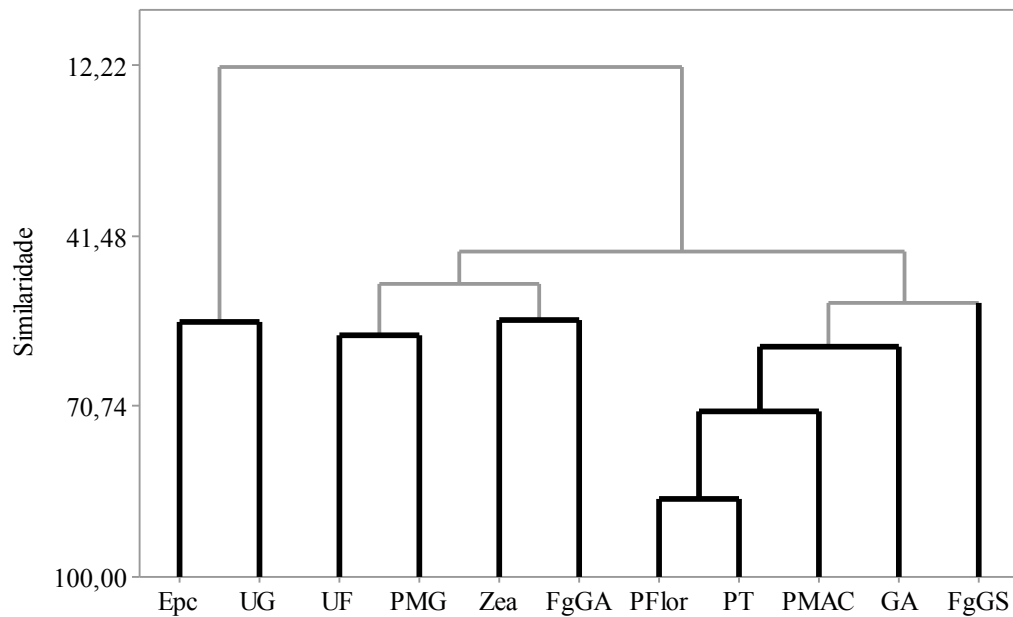


Figura 4. Dendrograma zearalenona: Análise de *cluster* pelo método completo à 55% de similaridade. Variáveis: Época de plantio (Epc), safrinha 2015 e 2016 e safra 2015/2016; Porcentagem de *F. graminearum* em grãos sadios (FgGS); umidade nos grãos (UG), em porcentagem; estado (UF); rendimento, dado por peso de 1000 grãos em gramas (PMG); teor de fumonisinas totais, somatório de FB1 e FB2 (FBT) expresso em $\mu\text{g}/\text{Kg}-1$; Porcentagem de *F. graminearum* em grãos sadios (FgGA); precipitação na floração (PFlor), mm; Precipitação total (PT), mm; Precipitação no mês anterior à colheita (PMAC), mm; percentual de grãos ardidos (GA)

ARTIGO 3

Uso de redes neurais artificiais na predição da contaminação por fumonisinas e zearalenona em milho

RESUMO

As fumoninas e zearalenona são micotoxinas de ampla ocorrência produzidas por *Fusarium* spp. e que podem ocasionar sérios danos à saúde humana e animal. Existem poucos estudos visando explicar a interação em campo entre micotoxinas, características agronômicas e clima. O objetivo deste trabalho foi identificar a possibilidade de se utilizar Redes Neurais Artificiais para prever a acumulação de fumonisinas e zearalenona em milho nas principais regiões produtoras de milho do Brasil. A arquitetura utilizada para a rede foi a *FeedForward Perceptron* com multicamadas, com uma camada oculta de neurônios. Devido à natureza não linear dos dados de fumonisina e zearalenona, utilizou-se a função de ativação sigmoide. Para isso os dados de fumonisinas e zearalenona foram convertidos para uma matriz binária 0 e 1, sendo os valores abaixo do limite máximo tolerado (LMT) pela legislação brasileira transformados em 0 e os valores acima do LMT transformados em 1. Para fumonisina o LMT é $5,000 \mu\text{g kg}^{-1}$ e para zearalenona $400 \mu\text{g kg}^{-1}$. Não foram obtidos modelos satisfatórios para ambas as micotoxinas com arquitetura de redes neurais artificiais testada neste trabalho. A ocorrência de zearalenona em altas concentrações ainda é muito limitada à região sul do Brasil, por isso o ideal é que primeiramente seja desenvolvido um modelo para essa região.

Palavras chave: redes neurais artificiais; arquitetura *Perceptron* multicamada; função de ativação sigmoide; fumonisina; zearalenona.

ABSTRACT

As fumoninas e zearalenona são micotoxinas de ampla ocorrência produzidas por *Fusarium* spp. e que podem ocasionar sérios danos à saúde humana e animal. Existem poucos estudos visando explicar a interação em campo entre micotoxinas, características agronômicas e clima. O objetivo deste trabalho foi identificar a possibilidade de se utilizar Redes Neurais Artificiais para prever a acumulação de fumonisinas e zearalenona em milho nas principais regiões produtoras de milho do Brasil. A arquitetura utilizada para a rede foi a *FeedForward Perceptron* com multicamadas, com uma camada oculta de neurônios. Devido à natureza não linear dos dados de fumonisina e zearalenona, utilizou-se a função de ativação sigmoide. Para isso os dados de fumonisinas e zearalenona foram convertidos para uma matriz binária 0 e 1, sendo os valores abaixo do limite máximo tolerado (LMT) pela legislação brasileira transformados em 0 e os valores acima do LMT transformados em 1. Para fumonisina o LMT é $5000 \mu\text{g kg}^{-1}$ e para zearalenona $400 \mu\text{g kg}^{-1}$. Não foram obtidos modelos satisfatórios para ambas as micotoxinas com arquitetura de redes neurais artificiais testada neste trabalho. A ocorrência de zearalenona em altas concentrações ainda é muito limitada à região sul do Brasil, por isso o ideal é que primeiramente seja desenvolvido um modelo para essa região.

Keywords: artificial neural network; multilayer perceptron; sigmoid activation function; fumonisin; zearalenone.

1 INTRODUÇÃO

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de fungos, comumente encontrados em alimentos e ração. As micotoxinas causam danos agudos e crônicos à saúde animal e humana em baixíssimas concentrações (Benett; Klich, 2003). São moléculas de baixo peso molecular produzidas durante metabolismo secundário de fungos filamentosos, muito estáveis química e termicamente, por isso resistem às técnicas de processamento industrial e a degradação no trato intestinal dos animais (Soldati, 2010). A síntese pode ocorrer em pré- ou pós-colheita (Berthiller *et al.*, 2007; Hermanns *et al.*, 2006).

Devido a seu elevado valor biológico, o milho é muito suscetível à incidência de fungos micotocicogênicos (Soldati, 2010). É comum que uma ou mais espécies estejam ocorrendo no mesmo grão, resultando em contaminações mistas por micotoxinas (Ali *et al.*, 1998; Schothorst & Egmond, 2004; Kawashima & Soares, 2006; Binder *et al.*, 2007; Queiroz *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*; 2017). No Brasil, cerca de 45% do milho produzido está contaminado com micotoxinas e estima-se que os gastos para manejo e, principalmente, com análises para assegurar a qualidade dos grãos sejam de aproximadamente US\$ 450 milhões ao ano (Santurio, 2009).

As micotoxinas produzidas por *Fusarium* spp. são de grande importância no mundo todo. As diferentes espécies do gênero apresentam capacidade distinta de produzir tipos específicos de micotoxinas (Leslie & Longrieco, 2014). As espécies *F. verticillioides* e *F. proliferatum* são as maiores produtoras de fumonisina, enquanto *F. graminearum* e *F. culmorum* se destacam na produção de zearalenona e dos principais tricotecenos (Parry *et al.*, 1995; Miller, 2008; Rocha *et al.*, 2014; Leslie & Longrieco, 2014).

Sob condições de campo, a produção de micotoxinas é influenciada pelos mesmos fatores que regem o desenvolvimento dos fungos: temperatura, umidade e injúria ocasionada por insetos (Bosco & Mollea, 2012). Todavia, alguns trabalhos demonstraram que a quantidade de micélio formado durante o processo de infecção nem sempre está correlacionada com os sintomas da doença e, principalmente, à produção de micotoxinas (Brunner *et al.*, 2009; Schlang & Duveiller, 2011). Isso pode ser explicado pelos diferentes tipos de relação que *Fusarium* ssp. estabelece com o hospedeiro. As infecções assintomáticas por vezes são mais comuns (Headrick & Patakay, 1991; Munkvold *et al.*, 1997; Bacon *et al.*, 2008;).

Muitos estudos avaliaram os fatores que afetam a biossíntese de fumonisinas e zearalenona sob condições controladas (Marín *et al.*, 2004). Porém, sob condições de campo, é necessário que se coordene informações agronômicas e fatores que possam influenciar a variação nos teores de micotoxinas. Para isso, o uso de ferramentas estatísticas preditivas podem ser muito úteis. Alguns sistemas de previsão para o risco de ocorrência de fumonisinas em milho obtiveram sucesso em pequenas áreas na Itália (Battilani *et al.*, 2008; Maiorano *et al.*, 2009). Também na Itália, foram obtidos resultados promissores na predição de zearalenona em trigo (Rossi *et al.*, 2003).

As Redes Neurais Artificiais (RNAs) são modelos matemáticos computacionais que se baseiam no método de aprendizagem de seres inteligentes para aprender através da experiência. Dentro das características importantes das redes neurais encontram-se: robustez, flexibilidade, paralelismo e alta capacidade de processar informações incertas (Specht, 1991; Capobianco, 2000; Chen & Manning, 2014; Zahara *et al.*, 2013).

O objetivo deste trabalho foi identificar utilizar RNAs para prever a acumulação de fumonisinas e zearalenona em milho nas principais regiões produtoras do Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Fitopatologia e Sanidade de grãos da EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, em uma parceria público-privada. Foram analisadas 591 amostras de grãos de milho obtidas em 12 estados nas safrinhas de 2015 (190 amostras) e 2016 (202 amostras), e na safra 2015/2016 (199 amostras).

A escolha dos locais de amostragem foi realizada de acordo com a distribuição da produção de milho no Brasil na primeira e segunda safra. Nas safrinhas, as amostras foram coletadas em Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul; e na safra, na região oeste da Bahia, Maranhão, Piauí, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná, Goiás, Santa Catarina, São Paulo e Distrito Federal.

As amostras foram obtidas sob condições de campo de duas maneiras: i) amostras de grãos e ii) amostras de espigas. Grande parte do material coletado foi obtida na forma de amostras de grãos. No momento da colheita, foram retiradas subamostras em vários pontos dos caminhões. As subamostras foram homogeneizadas

e uma amostra composta de 1 kg de grãos foi subtraída. As coletas de grãos foram realizadas somente quando havia a certeza de que apenas um híbrido foi colhido no talhão. A amostragem de espigas se deu em ocasiões em que a visita à propriedade não coincidiu com o momento da colheita, ou não se podia afirmar que o milho no caminhão pertencia a um único híbrido. As espigas, após a maturação fisiológica, foram coletadas de forma aleatória. O procedimento padrão adotado nessas circunstâncias estabeleceu uma distância mínima de segurança de 50 m entre a bordadura dos talhões e os pontos de amostragem de espigas, evitando-se a coleta em áreas sujeitas à interferência externas e buscando-se maior representatividade da área em questão. Em cada ponto, foram coletadas no mínimo 30 espigas por amostra. Após as coletas, as espigas foram debulhadas, os grãos homogeneizados, obtendo-se uma amostra final de 1 kg.

As amostras obtidas em campo foram encaminhadas à Embrapa Milho e Sorgo e, quando necessário, submetidas à secagem até atingir 13% de umidade. Em seguida, os grãos foram novamente homogeneizados e separados em subamostras de 0.5 kg. Uma subamostra foi encaminhada aos Laboratórios de Fitopatologia e Sanidade de Grãos enquanto a outra amostra foi encaminhada a um laboratório especializado para determinação dos teores de fumonisinas e zearalenona. As amostras foram acondicionadas em freezer a -20°C até o momento da avaliação.

Com um GPS, foram registradas as coordenadas geográficas de localização (latitude e longitude) de cada ponto de coleta para posterior correlação dos teores de fumonisinas e zearalenona e da incidência de fungos com os dados climáticos a nível local. Além disso, no momento da coleta de amostras levantadas informações referentes a data de plantio.

2.1 Determinação do percentual de grãos ardidos

A primeira variável determinada foi o rendimento de grãos (peso de 1000 grãos), utilizando-se para isso a metodologia preconizada pelas Regras Para Análise de Sementes (MAPA, 2009). Mensurou-se a umidade e a massa total de cada amostra e, na sequência, foram separadas oito repetições de 100 grãos (selecionados ao acaso, não havendo distinção entre grãos sadios e ardidos), cuja massa foi expressa em gramas.

A incidência de grãos ardidos foi feita pela separação visual de todos os grãos com descoloração em no mínimo 25% de sua superfície (variando de marrom claro a roxo ou, de vermelho-claro a vermelho-intenso), conforme os critérios estabelecidos pela legislação (BRASIL, 2011a). Os grãos ardidos foram contados e pesados.

2.2 Análise de patologia de grãos

Considerando-se a importância do gênero *Fusarium* para o milho e que suas infecções podem ser sintomáticas ou não, foi determinada a incidência de fungos em dois extratos diferentes: grãos ardidos e assintomáticos. Para cada extrato foram avaliados 100 grãos (quatro repetições de 25). Em amostras onde o número de grãos ardidos foi inferior a 100, todos foram analisados.

A metodologia utilizada foi a incubação em papel de filtro com congelamento (*Blotter Test*) (MAPA, 2009). Os grãos foram desinfestados com hipoclorito de sódio a 2% por 5 min e distribuídos em caixa gerbox contendo duas folhas de papel mata borrão estéril e embebido em ágar-ágar a 0,5%. As caixas foram mantidas sob luz contínua e temperatura ambiente por 24h (para estimular o início do processo germinativo). Após esse período, foram incubadas a -20°C por 24h (para inibir a germinação e evitar a contaminação cruzada entre os grãos). Por fim, o material foi incubado em câmaras sob temperatura constante de 25°C e fotoperíodo de 12h por 10 dias. Após esse período, os grãos foram avaliados individualmente com microscópio estereoscópico para identificação e quantificação de *Fusarium* spp. (complexo *G. fujikuroi*) e *F. Graminearum* através de caracteres morfológicos.

2.3 Análise de micotoxinas

As análises de fumonisinas (B1, B2 e totais) da safrinha 2015 foram realizadas no Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC), da Universidade Federal de Santa Maria (RS). As demais análises foram realizadas no laboratório Soluções Analíticas Microbiológicas e Tecnológicas (SAMITEC) em Santa Maria, RS.

As análises foram realizadas por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS) como descrito por Oliveira *et al.* (2017). Os limites de quantificação (LQ) e os coeficientes de recuperação (%) para FB1 foram de 125 µg kg⁻¹ - 101% e para FB2 de 125 µg kg⁻¹ - 96%. As estimativas de

incerteza foram FB1 ($\pm 33,2 \mu\text{g kg}^{-1}$; $K=2,18$) e FB2 ($\pm 35,2 \mu\text{g kg}^{-1}$; $K=2,52$). Como a legislação brasileira (BRASIL, 2011) não considera as fumonisinas separadamente, os valores de FB1 e FB2 foram somados para obtenção do valor de fumonisinas totais (FBT). Assim, para as análises subsequentes deste trabalho foram utilizados os valores de FBT.

As análises de zearalenona foram realizadas nas amostras coletadas na safrinha 2015, safra 2015/16 e safrinha 2016. Neste caso também foi utilizada a metodologia LC-MS/MS descrita por Oliveira *et al.* (2017). O limite de detecção de $20 \mu\text{g/kg}$, coeficiente de recuperação de 85% e, estimativa de incerteza de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($0,53 \mu\text{g kg}^{-1}$).

2.5 Obtenção de dados climáticos

Utilizou-se a base de dados CHIRPS - Climate Hazards Group InfraRed Precipitation with Station (<http://chg.geog.ucsb.edu/data/chirps/>) para fazer o levantamento do índice pluviométrico de cada ponto amostrado. Os dados foram agrupados em períodos de 10 dias (decêndios).

2.6 Análise dos dados

Foram realizados dois treinamentos de Redes Neurais Artificiais (RNA) para explicar a variabilidade de ocorrência de fumonisinas e zearalenona em plantações de milho no Brasil. Os treinamentos foram feitos no software Tiberius Data Mining. A arquitetura utilizada para a rede foi a *FeedForward Perceptron* com multicamadas. Neste caso uma camada oculta de neurônios. Devido à natureza não linear dos dados de fumonisina e zearalenona, utilizou-se a função de ativação sigmoide. Para isso, os dados de fumonisinas e zearalenona foram convertidos para uma matriz binária 0 e 1, sendo os valores abaixo do limite máximo tolerado (LMT) pela legislação brasileira transformados em 0 e os valores acima do LMT transformados em 1. Para fumonisina, o LMT é $5000 \mu\text{g kg}^{-1}$ e para zearalenona, $400 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Inicialmente foi utilizada uma camada com 17 neurônios de entrada (variáveis de entrada ou *input*): dois neurônios referentes ao período de cultivo (época e ano); seis neurônios referentes ao local (latitude, longitude, chuva durante a floração, chuva no mês anterior a colheita, chuva no último decêndio e chuva total); dois neurônios

relativos a características do híbrido (textura de grãos e presença de tecnologia Bt); três neurônios referentes a características do sistema de manejo (sistema, densidade de plantio e número de aplicações de fungicida); dois neurônios referentes à qualidade de grãos (peso de 1000 grãos e porcentual de grãos ardidos); e dois neurônios relacionados ao patógeno (para fumonisinas, incidência de *Fusarium* spp. em grãos sadios e em grãos ardidos; para zearalenona, incidência de *Fusarium graminearum* em grãos sadios e em grãos ardidos).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Redes neurais artificiais na previsão dos níveis de contaminação por fumonisinas

Inicialmente, foram treinadas redes com os dados brutos de fumonisinas, com arquitetura Perceptron multicamadas, com cinco neurônios ocultos, um linear e 4 não lineares. O processo de modelagem não conseguiu explicar a variabilidade na ocorrência de fumonisinas com base nos 17 neurônios de entrada, que explicaram somente 20% da variação. Na figura 1 observa-se que a variabilidade não é explicada, já que os valores estimados tendem a ficar próximos à média.

A RNA tende a definir a ocorrência de micotoxina como *outlier*, por isso não houve nenhuma associação robusta entre as variáveis de *input* e a variável de *output* que conseguisse explicar o evento em função do conjunto de dados. Conhecida a natureza variável dos dados de micotoxinas (Coker *et al.*, 1995; Escrivá *et al.*, 2017; Rensburg *et al.*, 2011), foram treinadas novas RNAs substituindo-se a função de ativação (na tentativa de identificar um modelo que explique a incidência de fumonisinas em elevadas concentrações). Para utilizar a função de ativação sigmoide, os dados de fumonisina foram transformados em uma matriz binária (0= valores <5000 $\mu\text{g kg}^{-1}$; 1= >5000 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Novamente diversas combinações entre neurônios de entrada e neurônios de segunda camada foram utilizadas, todavia, os modelos gerados também não foram eficientes. A rede com arquitetura Perceptron multicamadas com função de ativação sigmoide que conseguiu explicar 86% da variação de fumonisina demandou 14 variáveis de input e 6 neurônios (Figura 2).

Os modelos obtidos conseguiram explicar de 42 a 86% da variação, porém, mesmo os modelos mais eficientes não apresentaram associação robusta entre a incidência de fumonisinas e as variáveis de *input*. O acréscimo ou a retirada de um neurônio modificava substancialmente o desempenho global da rede, afetando seriamente a importância relativa das variáveis testadas e eficiência do modelo. A retirada de um neurônio reduziu a eficiência do modelo em até 30%. Além disso, a tentativa de simplificar a rede retirando-se variáveis associadas a menos de 20% da variação também resultou em alterações significativas do modelo.

É sabido que existem diferenças significativas da biossíntese de fumonisina mesmo em laboratório sob condições controladas (Marín *et al.*, 2004). O insucesso em se estabelecer um modelo preditivo através de RNAs pode estar relacionada à complexidade da interação entre todos os fatores que de alguma maneira podem interferir na produção de fumonisinas. Existem diversas referências na literatura quanto a grande variabilidade associada à habilidade toxigênica de diferentes isolados de *F. verticillioides* (Nelson *et al.*, 1991; Picot *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2011; Lanza *et al.*, 2014;), principal espécie produtora de fumonisinas associadas a grão de milho no Brasil (Lanza *et al.*, 2014). A produção de fumonisinas é codificada por um cluster de 16 genes e estudos recentes mostraram que a biossíntese pode ser fortemente regulada à nível de transcrição através de várias vias (Blacutt *et al.*, 2018).

O percentual de grãos ardidos na amostra também não é determinante para a presença de fumonisinas. A ocorrência de grãos ardidos pode estar associada a outros gêneros de fungos que não produzem fumonisinas, como *Stenocarpella*, *Aspergillus* e *Penicillium* (Casela *et al.*, 2006). Além disso, *Fusarium* spp. podem produzir micotoxinas mesmo em grãos considerados sadios, pois colonizam os tecidos do hospedeiro de diferentes maneiras e as infecções podem ser sintomáticas ou não, pontuais ou espalhadas por toda a espiga (Bacon *et al.*, 1992; 1996; 2008; Headrick & Munkvold *et al.*, 1997).

Existem poucos estudos correlacionando a incidência de fumonisinas a genótipos de milho nas regiões tropicais, inviabilizando uma análise mais detalhada (Munhoz *et al.*, 2015). Quanto a constituição do grão, Dalla'as *et al.* (2012) observaram que a ocorrência de fumonisinas era maior em grãos com maior teor de ácido linoleico.

Por muito tempo, o plantio de híbrido com tecnologia Bt foi apontado como uma das estratégias de manejo a ser utilizada no controle de fumonisinas (Munkvold *et al.*, 1999; Bruns *et al.*, 2003; Hammond *et al.*, 2004; De La Campa *et al.*, 2005; Abbas *et al.*, 2007; Barroso *et al.*, 2017). Porém, em trabalho recente realizado por Barroso *et al.* (2017), observou-se maiores níveis de contaminação pela micotoxina em três híbridos Bt do que com em seus isogênicos não-transgênicos, sugerindo que outros parâmetros estão correlacionados a produção de micotoxina.

O uso de fungicidas no controle de fumonisinas em milho também é um assunto controverso. Muitos estudos mostram que os fungicidas reduzem o crescimento do micélio, porém há um incremento na produção de micotoxinas (Moss & Frank, 1985; Doohan *et al.*, 1999; Falcão *et al.*, 2011; Miguel *et al.*, 2015). Mennet *et al.* (2010) observaram redução no crescimento de *F. verticillioides*, mas nenhum efeito sobre a produção de fumonisinas. Marín *et al.* (2013) observaram que o uso do tebuconazole reduz o crescimento do micélio de *F. verticillioides* e *F. proliferatum* e a produção de fumonisinas, no entanto, a eficiência do fungicida é altamente condicionada à atividade de água e temperatura.

A biossíntese de fumonisinas pode ser afetada por fatores ambientais. Ensaios cinéticos demonstraram que o estresse hídrico pode ser um fator relevante para acumulação de fumonisina, principalmente nas fases que sucedem a colonização do tecido do hospedeiro (Marín *et al.*, 2004; Jurado *et al.*; 2008; Fanelli *et al.*; 2013). Sob condições de campo, Ono *et al.* (1999) verificaram que elevada precipitação no mês anterior à colheita influenciou significativamente a ocorrência de fumonisinas. Entretanto, ao longo do desenvolvimento da cultura a ocorrência de estresse hídrico contribui positivamente para o acúmulo de fumonisinas (Torelli *et al.*, 2012).

Torelli *et al.* (2012) também tentaram desenvolver um sistema preditivo para fumonisinas em uma pequena região no nordeste da Itália e, assim como neste trabalho, também não obtiveram sucesso. O sistema envolvendo o clima, hospedeiro, sistema de plantio, patógeno e biossíntese de fumonisinas é muito complexo e, à luz da análise realizada, não pôde ser explicado utilizando RNAs.

3.2 Redes neurais artificiais na previsão dos níveis de contaminação por zearalenona

As RNAs com arquitetura Perceptron multicamadas com função de ativação sigmoide, treinadas para explicar a os níveis de contaminação por zearalenona conseguiram explicar de 95 a 98% da variação, independentemente da quantidade de neurônios em segunda camada ou variáveis de *input*. Porém, nenhum dos modelos obtido pode ser considerado eficiente, pois a variação basicamente foi explicada pela latitude. O padrão observado pode ser explicado pela distribuição da zearalenona no Brasil, concentrada na região Sul, principalmente no Rio Grande do Sul, onde são encontradas as maiores taxas de incidência de *F. graminearum* (Sabino *et al.*, 1989). Assim, para elaboração de um modelo mais eficiente deve ser realizado um estudo isolando algumas regiões onde a ocorrência de zearalenona é mais expressiva e os níveis de contaminação mais altas.

4 CONCLUSÕES

A partir da metodologia utilizada não foi possível definir um modelo de previsão para fumonisina e zearalenona.

A interação entre fumonisina, sistema de plantio, hospedeiro e clima é extremamente complexo.

A ocorrência de zearalenona em altas concentrações ainda é muito limitada a região sul do Brasil. Por isso, o ideal é que primeiramente seja desenvolvido um modelo para essa região.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, H., Shier, W., Cartwright, R. 2007. Effect of temperature, rainfall and planting date on aflatoxin and fumonisin contamination in commercial Bt and non-Bt corn hybrids in Arkansas. *Phytoprotection* 88:41-50.

Ali, N., Sardjono., Yamashita, A., Yoshizawa, T. 1998. Natural co-occurrence of aflatoxins and *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) in corn from Indonesia. *Food Additives & Contaminants* 15:377-384.

Bacon, C.W.; GLENN, A.E.; YATES, I.E. *Fusarium verticillioides*: endophytic association with maize for reduce fumonisins accumulation. *Toxin Reviews*, v. 27, p. 411-446, 2008.

Bacon, C. W., Bennett, R. M., Hinton, D. M., Voss, K. A. 1992. Scanning electron microscopy of *Fusarium moniliforme* within asymptomatic corn kernels and kernels associated with equine leukoencephalomalacia. *Plant Disease* 76:144-148.

- Bacon, C. W., Hinton, D. M. 1996. Fusaric acid and pathogenic interactions of corn and non-corn isolates of *Fusarium moniliforme*, a non-obligate pathogen of corn. Em: Jackson, L. S., DeVries, J. W., Bullerman, L. B. (Eds). Fumonisin in food, Plenum Press, p. 175-191.
- Barroso, V. M., Rocha, L. O., Reis, T. A. *et al.* 2017. *Fusarium verticillioides* and fumonisin contamination in Bt and non-Bt maize cultivated in Brazil. *Mycotoxin research* 33:121-127.
- Battilani, P., Pietri, A., Barbano, C., Scandolara, A., Bertuzzi, T., Marocco, A. 2008. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:10433-10438.
- Brunner, K.; Paris, M.P.K.; Paolino, G.; Bürstmayr, H.; Lemmens, M.; Berthiller, F.; Schuhmacher, R.; Krska, R.; Mach, R. L. 2009. A reference-gene-based quantitative PCR method as a tool to determine *Fusarium* resistance in wheat. *Analytical and bioanalytical chemistry* 395:1385-1394.
- Bosco, F., Mollea, C. 2012. Mycotoxin in Food. Em: Valdez, B. *Food Industrial Processes – Methods and Equipment*. In Tech, p. 169-200.
- Blacutt, A. A., Gold, S. E., Voss, K. A., Gao, M., Glenn, A. E. 2018. *Fusarium verticillioides*: Advancements in understanding the toxicity, virulence, and niche adaptations of a model mycotoxigenic pathogen of maize. *Phytopathology* 108:312-326.
- Binder, E. M., Tan, L. M., Chin, L. J., Handl, J., Richard, J. 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal feed science and technology* 137:265-282.
- Benett, J.W., Klich, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 6: 497-516.
- Berthiller, F., Sulyok, M., Krska, R., Schuhmacher, R. 2007. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *International Journal of Food Microbiology* 119:33-37.
- Bruns, H. A. 2003. Controlling aflatoxin and fumonisin in maize by crop management. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews* 22:153-173.
- Casela, C. R., Ferreira, A. S., Pinto, N. F. J. A. 2006. Doenças da cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo- Circular técnica 83. 14 p.
- Capobianco, E. 2000. Neural networks and statistical inference: seeking robust and efficient learning. *Computational statistics & data analysis* 32:443-454.
- Chen, D., Manning, C. 2014. A fast and accurate dependency parser using neural networks. Em: *Proceedings of the 2014 conference on empirical methods in natural language processing (EMNLP)*: 740-750.
- Coker, R. D., Nagler, M. J., Blunden, G., Sharkey, A. J., Defize, P. R., Derksen, G. B., Whintaker, T. B. 1995. Design of sampling plans for mycotoxins in foods and feeds. *Natural Toxins* 3:257-262.

Dall'Asta, C., Falavigna, C., Galaverna, G., Battilani, P. 2012. Role of maize hybrids and their chemical composition in *Fusarium* infection and Fumonisin production. *Journal of agricultural and food chemistry* 60:3800– 3808

De La Campa R., Hooker, D. C., Miller, J. D., Schaafsma, A. W., Hammond, B. G. 2005. Modeling effects of environment, insect damage, and Bt genotypes on fumonisin accumulation in maize in Argentina and the Philippines, *Mycopathologia* 159:539-552.

Doohan, F. M., Weston, G., Rezanoor, H. N., Parry, D. W., Nicholson, P. 1999. Development and use of a reverse transcription-PCR assay to study expression of Tri5 by *Fusarium* species in vitro and in planta. *Applied Environment Microbiology* 65:3850–3854.

Escrivá, L. Font, G., Manyes, L., Berrada, H. 2017. Studies on the presence of mycotoxins in biological samples: an overview. *Toxins* 9:251.

Falcão, V. C. A., Ono, M. A., Miguel, T. A., Vizoni, E., Hirooka, E. Y., Ono, E. Y. S. 2011. *Fusarium verticillioides*: Evaluation of fumonisin production and effect of fungicides on in vitro inhibition of mycelial growth *Mycopathologia* 171:77-84.

Fanelli, F., Inversen, A., Logrieco, A. F., Mulè, G. 2013. Relationship between fumonisin production and FUM gene expression in *Fusarium verticillioides* under different environmental conditions. *Food Additives & Contaminants: Part A* 30:365-371.

FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations), 1997. Disponível em < <http://www.fao.org/wairdocs/x5012o/X5012o00.htm#Indice>> Último acesso em: 24/11/2014

Firrao, G., Torelli, E., Gobbi, E., Raranciuc, S., Bianchi, G. and Locci, R. 2010. Prediction of milled maize fumonisin contamination by multispectral image analysis. *Journal of Cereal Science* 52:327–330.

Hammond, B. G., Campbell, K., Pilcher, C., DeGooyer, T., Robinson, A., McMillen, B., Spangler, S., Riordan, S., Rice, L., Richard, J. 2004. Lower fumonisin mycotoxin levels in the grain of Bt corn grown in the United States in 2000–2002. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 52:1390–1397.

Headrick, J. M., Pataky, J. K. 1991. Maternal influence on the resistance of sweet corn lines to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 81:268-74.

Hermanns, G., Pinto, F. T., Kitazawa, S. E. 2006. Fungos e fumonisin no período pré-colheita do milho. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas* 26:7-10.

Jurado, M., Marín, P., Magan, N., González-Jaén, M. T. 2008. Relationship between solute and matric potential stress, temperature, growth, and FUM1 gene expression in two *Fusarium verticillioides* strains from Spain. *Applied and Environmental Microbiology* 74:2032-2036.

Kawashima, L. M., Soares, L. M. V. 2006. Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26:516-521.

Leslie, J. F., Logrieco, A. 2014. *Mycotoxin reduction in grain chains*. John Wiley & Sons. 352p.

Lanza, F. B., Zambolim, L., Costa, R. V., Queiroz, V. A. V., Cota, L. V., Silva, D. D., Souza, A. G. C., Figueiredo, J. E. F. 2014. Prevalence of fumonisin-producing *Fusarium* species in Brazilian corn grains. *Crop Protection* 65:232-237.

Maiorano, A., Reyneri, A., Sacco, D., Magni, A., Ramponi, C. A. 2009. Dynamic risk assessment model (FUMAGrain) of fumonisin synthesis by *Fusarium verticillioides* in maize grain in Italy. *Crop Protection* 28: 243-256.

Marín, S. Magan, N., Ramos, A. J., Sanchis, V. 2004. Fumonisin-producing strains of *Fusarium*: a review of their ecophysiology. *Journal of food protection* 67:1792-1805.

Marín, P., de Ory, A., Cruz, A., Magan, N., González-Jaén, M.T. 2013. Potential effects of environmental conditions on the efficiency of the antifungal tebuconazole controlling *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* growth rate and fumonisin biosynthesis. *International Journal Food Microbiology* 165:251-258.

Menniti, A. M., Gregori, R., Neri, F. 2010. Activity of natural compounds on *Fusarium verticillioides* and FUMO production in stored maize kernels. *International Journal Food Microbiology* 136:304-309.

Miguel, T., Bordini, J. G., Saito, G. H., Andrade, C. G., Ono, M. A., Hirooka, E. Y., Vizoni, É., Ono, E. Y. 2015. Effect of fungicide on *Fusarium verticillioides* mycelial morphology and fumonisin B1 production. *Brazilian Journal of Microbiology* 46:293-299.

Moss, M. O., Frank, J. M. 1985. Influence of the fungicide tridemorph on t-2 toxin production by *Fusarium sporotrichoides*. *Transactions of the British Mycological Society* 84:585-590.

Munkvold, G. P., McGee, D. C., Carlton, W. M. 1997. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 87: 209-217.

Munhoz, A. T., Carvalho, R. V., Querales, P. J. 2015. Relação entre resistência de linhagens tropicais de milho à podridão de espiga e ao acúmulo de fumonisinas provocados por *Fusarium verticillioides*. *Summa Phytopathol* 41:144-148.

Munkvold, G. P., Hellmich, R. L. Rice, L. G. 1999. Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and non-transgenic hybrids. *Plant Disease* 83:130-138.

Nelson, P. E., Planttner, R. D., Shackelford, D. D., Desjardins, A. E. 1991. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. *Applied and Environmental Microbiology* 57:2410-2412.

- Oliveira, M. S., Rocha, A., Sulyok, M., Krska, R., Mallmann, C. A. 2017. Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region of Brazil. *Food Control* 73:127-132.
- Ono, E. Y. S., Sugiura, Y., Homechin, M., Kamogae, M., Vizzoni, E., Ueno, Y., Hirooka, E. Y. 1999. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil. *Mycopathologia* 47:139-148.
- Picot, A., Barrean, C., Pinson-Gadais, L., Caron, D., Lannou, C., Richard-Forget, F. 2010. Factors of the *Fusarium verticillioides*-maize environment modulating fumonisin production. *Critical Reviews in Microbiology*. 36:221-231.
- Queiroz, V. A. V., Alves, G. L. O., Ferreira, P.; Conceição, R. R. P., Guimarães, L. J. M., Mendes, S. M., Ribeiro, P. E. A., Costa, R. V. 2012. Occurrence of fumonisins and zearalenone in maize stored in family farm in Minas Gerais, Brazil. *Food Control* 28:83-86.
- Rensburg, B. J. V., Flett, B. C., McLaren, M. L. McDonald, A. H. 2011. Sampling variation in the quantification of fumonisins in maize samples, *South African Journal of Plant and Soil* 28:90-96.
- Rocha, L. O., Reis, G. M., da Silva, V. N., Braghini, R., Teixeira, M. M., Corrêa, B. 2011. Molecular characterization and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* isolated from corn grains of different geographic origins in Brazil. *International journal of food microbiology* 145:9-21.
- Rossi, V., Giosue, S., Patteri, E., Spanna, F., Del Vechio, A. 2003. A model estimating the risk of fusarium head blight in wheat. *EPPO Bulletin* 33, 421–425.
- Schlang, N., Duveiller, E. 2010. Current approaches and utilization of new screening techniques for evaluation of FHB resistance at CIMMYT. In *Proceedings of the 11th European Fusarium Seminar* (pp. 87–88). Radzikow, Poland.
- Schothorst, R. C., van Egmond, H. P. 2004. Report from SCOOP task 3.2.10 “collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states”–Subtask: trichothecenes. *Toxicol Lett* 153:133-143.
- Soldati, R.C. *Micotoxinas em alimentos vegetais*. Ixtlan, Viçosa, 2010, 120 p.
- Specht, D. F. 1991. A general regression neural network. *IEEE transactions on neural networks* 6:568-576.
- Torelli, E., Firrao, G., Bianchi, G., Saccardo, F., Locci, R. 2012. The influence of local factors on the prediction of fumonisin contamination in maize. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92:1808-1814.
- Zahra, M. M., Essai, M. H., Ellah, A. R., Ali R. Abd Ellah. 2013. Robust neural network classifier 6p.

FIGURAS

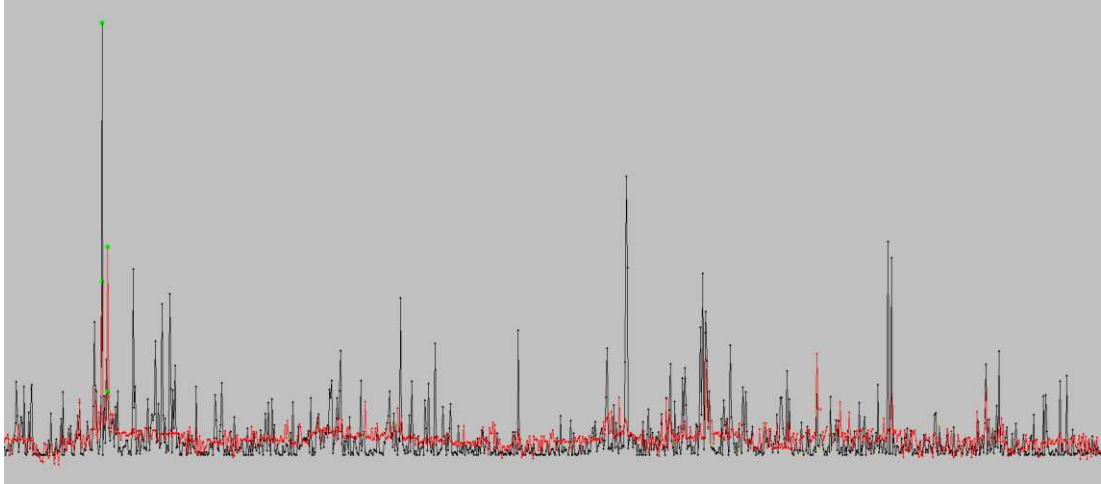


Figura 1. Ajuste do modelo de RNA aos 590 dados de input. A linha vermelha mostra os valores estimados pelo modelo, enquanto a linha preta indica os valores reais de fumonisinas totais presentes nas amostras.

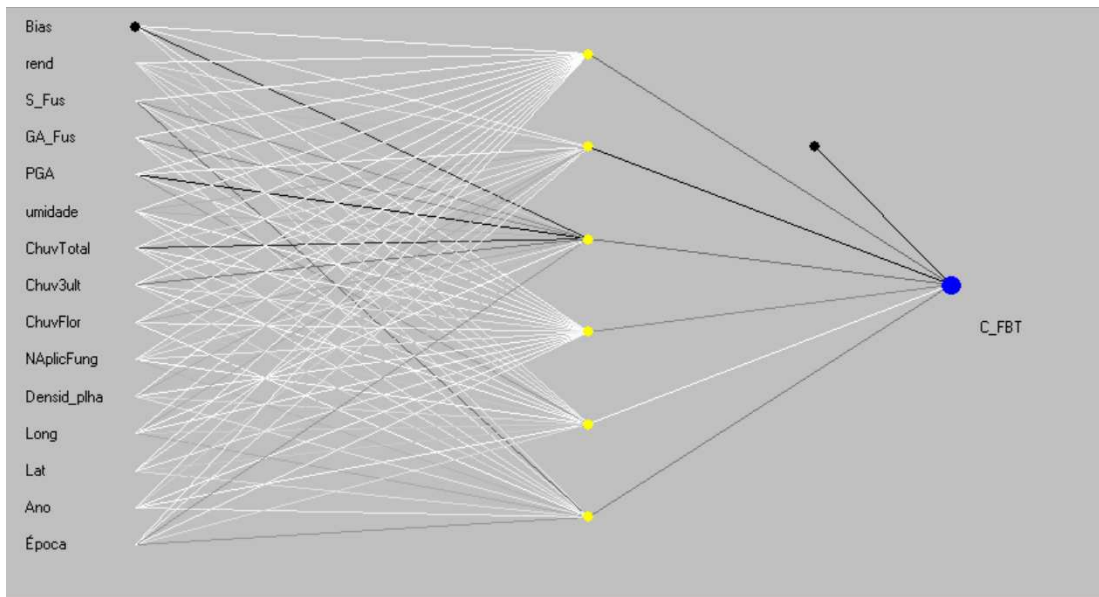


Figura 2. Rede Neural Artificial Perceptron multicamada com seis neurônios não lineares utilizada para analisar a ocorrência de fumonisinas nas principais regiões produtoras de milho do Brasil.

CONCLUSÕES GERAIS

1. As fumonisinas estão disseminadas por todas as principais regiões produtoras de milho no Brasil, enquanto a zearalenona está concentrada na região Sul; a medida que o cultivo do trigo se expande para outras regiões do país a contaminação por zearalenona também tende a aumentar; o milho brasileiro pode ser considerado de elevada qualidade quanto aos teores de fumonisina e zearalenona, dado que a maioria das amostras se encontram abaixo do limite máximo tolerado (LMT) estipulado pela legislação e são muito raros os casos de co-contaminação em que ambas apresentam-se acima do LMT.
2. Embora o número de amostras com grãos ardidos e micotoxinas seja elevado, o milho brasileiro pode ser considerado de boa qualidade, já que a maior parte das amostras está abaixo dos limites estabelecidos pela legislação quanto à contaminação por grãos ardidos; os gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* foram os mais frequentes em grãos de milho nas regiões brasileiras amostradas; há correlação entre o rendimento de grãos e o estado em que as amostras foram coletadas e entre a precipitação e incidência de grãos ardidos.
3. A partir da metodologia utilizada não foi possível definir um modelo de previsão para fumonisina e zearalenona utilizando-se redes neurais artificiais; a interação entre fumonisina, sistema de plantio, hospedeiro e clima é extremamente complexo; a ocorrência de zearalenona em altas concentrações ainda é muito limitada a região sul do Brasil; por isso, o ideal é que primeiramente seja desenvolvido um modelo para essa região.