

Incidência de fungos e micotoxinas em grãos de milho armazenados sob diferentes condições

Incidence of fungi and mycotoxins in stored corn under different conditions

RIALA6/1022

Vanessa PEZZINI¹; Eunice VALDUGA¹; Rogério Luis CANSIANI*

* Endereço para correspondência: 1 Departamento de Engenharia de Alimentos – URI – Campus de Erechim, Av. Sete de Setembro, 1621, Erechim, 99700-000, RS, Brasil, fone:(0xx)54.520.9000, ramal: 9170, Fax:(0xx)54.520.9090 e-mail: cansian@uricer.edu.br.

Recebido: 21/02/2005 – Aceito para publicação: 21/06/2005.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi identificar, quantificar e avaliar a ocorrência de fungos e verificar a incidência de micotoxinas (aflatoxinas e zearalenona) em grãos de milho armazenados por um período de cinco meses, sob diferentes condições (com e sem controle de temperatura e aeração). Isolaram-se e identificaram-se os fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium roseum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium graminearum* e *Penicillium* sp presentes nos grãos de milho. Os fungos *A. flavus*, *F. roseum* e *Penicillium* sp apresentaram variação de crescimento de 30 a 98 %, de 3 a 30 % e de 34 a 90 %, respectivamente. A diferença no crescimento dos fungos não foi causada pela umidade, pois em ambos os silos foi inferior a 12 %. Os principais fatores que influenciaram no crescimento possivelmente estejam relacionados à temperatura associada à aeração, pois se verificou maior crescimento no silo sem controle de temperatura e aeração, uma vez que os grãos armazenados nos dois silos foram colhidos na mesma época e de uma única região, portanto sujeitas às mesmas variações ambientais. A micotoxina detectada no silo A (aflatoxina B₁) já se encontrava presente nos grãos no início do armazenamento, mantendo-se nos mesmos limites de detecção ao final do período de armazenamento.

Palavras-Chave. milho em grão, condições de armazenamento, fungos, micotoxinas, aflatoxinas, zearalenona.

ABSTRACT

The aim of this work was to perform the identification, quantification, and investigation of the incidence of fungi in corn grain samples submitted to two different conditions (with or without control of temperature and of aeration) for a period of five months. Occurrence of mycotoxins (aflatoxins and zearalenone) was also studied. The following fungi were isolated and identified: *Aspergillus flavus*, *Fusarium roseum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium graminearum*, and *Penicillium* sp. The fungi *A. flavus*, *F. roseum*, and *Penicillium* sp presented variation in growing on the grains of 30 - 98 %, 3 - 30 %, and 34 - 90 %, respectively; and the a highest fungus growth was verified in corn grain samples without environment control. The difference verified in observe on fungi growth could not attributed to grain humidity, since the moisture analysis revealed a content inferior to 12 % in both samples. The factors that mostly influenced on the growth might be the temperature associated with aeration, since the grains stored in both silos were harvested at the same period of the year at the same region, thus they were submitted to the same environmental conditions. The mycotoxin detected in silo A (aflatoxin B₁) was already present in grain before being stored, and the aflatoxin concentration was at same levels until the end of storage period.

Key Words. corn, storage, fungi, mycotoxins, aflatoxins, zearalenone.

INTRODUÇÃO

Os fatores que afetam o crescimento de fungos nos grãos de milho são principalmente teor de umidade dos grãos, temperatura, tempo, condição física (grãos quebrados) e sanitária do grão, nível de inóculo do fungo, conteúdo de oxigênio e armazenamento, insetos e ácaros. A invasão de um lote de grãos por insetos pode iniciar ou agravar o desenvolvimento de fungos, pois através de sua atividade metabólica há um aumento de teor de umidade e temperatura da massa dos grãos^{1,2}.

Os fungos que invadem sementes e grãos em geral são os que infectam o produto ainda no campo e os de armazenamento, que invadem o milho pouco antes e durante o armazenamento. A distinção entre fungos de campo e de armazenamento não é baseada na classificação taxonômica, mas de acordo com as condições ambientais e/ou ecológicas que favorecem o crescimento dos mesmos. Também não é absoluta, pois é baseada nos seus hábitos de crescimento e onde os danos ocorrem. Os fungos do campo requerem um teor de umidade em equilíbrio com uma umidade relativa de 90 a 100 % para crescerem. Os principais gêneros são *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Nigrospora*, *Helminthosporium*, *Alternaria* e *Cladosporium* que invadem grãos e sementes durante o amadurecimento e o dano é causado antes da colheita. Estes fungos não se desenvolvem normalmente durante o armazenamento, exceto em milho armazenado com alto teor de umidade³.

Os fungos de armazenamento *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor* são encontrados em grande número em armazéns, moinhos, silos, moegas, elevadores, equipamentos e lugares onde os produtos agrícolas são armazenados, manuseados e processados. Causam danos ao produto somente se as condições de armazenagem forem impróprias à manutenção da qualidade do produto. Os fungos do gênero *Aspergillus* (*A. halophilicus*, *A. restrictus*, *A. glaucus*, *A. candidus*, *A. alutaceus* e *A. flavus*) e os do gênero *Penicillium* (*P. viridicatum*, *P. verrucosum*) são os indicadores de deterioração em sementes e grãos causando danos no germe, descoloração, alterações nutricionais, perda de matéria seca e os primeiros estágios da deterioração microbiológica². Porém estes fungos podem invadir os grãos de milho ainda no campo, causando inclusive várias doenças, como a podridão de sementes e do colmo^{4,5}. Interferências climáticas foram relacionadas com a predominância de linhagens toxigênicas⁶.

As micotoxinas, dentre elas as aflatoxinas e zearalenona, são compostos tóxicos produzidos por fungos, que podem causar danos à saúde de homens e animais⁷, bem como ocasionar grandes perdas econômicas. As aflatoxinas são produtos do metabolismo secundário de fungos, predominantemente de *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, sendo as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ as mais conhecidas. A zearalenona é produzida por várias espécies de *Fusarium*, com ocorrência em milho, cevada, trigo e aveia⁸.

Os trabalhos de ocorrência de fungos e micotoxinas em alimentos consumidos no Brasil, têm contribuído para avaliação e estudos das medidas a serem tomadas para prevenção de contaminação. Incidência de aflatoxinas em derivados de milho e zearalenona em milho, têm sido relatadas^{9,10,11,12,13}.

O presente trabalho teve por objetivo identificar, quantificar e avaliar a ocorrência de fungos, bem como verificar a incidência de micotoxinas (aflatoxina e zearalenona) em grãos de milho, armazenados sob diferentes condições.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Acompanhou-se dois silos de armazenamento de grãos de milho, um na cidade de Erebang/RS (Silo A) com temperatura de 13 a 14 °C e aeração controlada (0,05 m³.min⁻¹.ton⁻¹) e outro na cidade de Getúlio Vargas/RS (Silo B) sem controle, apenas com secagem dos grãos e mantido a temperatura ambiente (20 ± 5 °C). O período de coleta das amostras foi de 12 de maio a 03 de setembro de 2003, correspondendo aos 0, 30, 50, 62, 74, 92 e 113 dias de armazenamento. Para as análises de micotoxinas, efetuou-se duas amostragens de cada silo, aos 0 e 113 dias de armazenamento, respectivamente.

Amostragens representativas dos silos (cinco pontos) foram coletadas com o auxílio de um calador. As amostras foram homogeneizadas, divididas em frações de 1,0 Kg, acondicionadas em frascos plásticos codificados e enviadas ao laboratório para análises de umidade, identificação e quantificação de fungos e de micotoxinas (aflatoxinas e zearalenona). Para a identificação e quantificação dos fungos foram utilizados os grãos de milho inteiros e para as demais determinações as amostras foram moídas, classificadas por tamanho de partícula em peneira 20 mesh (0,84 mm), submetidas ao quarteamento e analisadas em triplicata.

Determinação de Umidade

A análise de umidade foi realizada em aparelho higrométrico (controle *in loco*) e pelo método de dessecação em estufa com ar circulante a 105 °C¹⁴.

Isolamento e Identificação Fúngica

Para semeadura dos grãos de milho foi utilizado o método adotado por Christensen e Meronuck¹⁵, modificado. Plaquearam-se 100 grãos por amostragem em triplicata, em meio de cultura Agar Batata Dextrose (PDA) acidificada com ácido tartárico a 10 % e incubou-se em estufa a 25°C com iluminação por 5 dias.

A identificação e quantificação dos fungos foram realizadas com o auxílio de microscópio estereoscópico, onde se quantificou em percentual de crescimento, considerando-se a presença ou ausência em 100 grãos de milho. Foram pesquisados os fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, *F. roseum*, *F. graminearum* e *Penicillium sp* pelas

suas estruturas reprodutivas e acompanhou-se o desenvolvimento no decorrer do armazenamento¹⁶.

Os dados de quantificação dos fungos foram tratados estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,01$), com uso do software Statistica 5.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Detecção e Quantificação de Micotoxinas

A extração e purificação das aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) foi feita segundo Soares e Rodriguez-Amaya¹⁷. As aflatoxinas foram identificadas e quantificadas por cromatografia em camada delgada (placas de sílica gel 60 G, Merck), utilizando-se como fase móvel tolueno:acetato de etila:clorofórmio:ácido fórmico (70:50:50:20 v/v/v/v), descrita por Gimeno¹⁸. As leituras das fluorescências de amostra e padrões foram feitas em densitômetro, a 366 nm e o cálculo das concentrações foi obtido através das curvas de calibração. A Curva das aflatoxinas (AF) foi realizada com os seguintes valores: AFB1 = 1,196 $\mu\text{g/mL}$; AFB2 = 0,96 $\mu\text{g/mL}$; AFG1 = 1,71 $\mu\text{g/mL}$ e AFG2 = 1,43 $\mu\text{g/mL}$. Essas concentrações foram aplicadas nas quantidades de 1,0 μL ; 2,0 μL e 4 μL com três repetições.

A zearalenona foi extraída e quantificada segundo procedimentos descritos por Visconti e Pascale¹⁹. A quantificação foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de fluorescência (SHIMADZU, modelo LC 10AD, excitação $\lambda = 276$ nm e emissão $\lambda = 460$ nm), coluna Agilent Zorbax C18 (5 μm , 250 x 4,6 mm), pré-coluna Agilent Zorbax C18 (5 μm , 25 mm x 4,6 mm), com fluxo de 1 mL/minuto. A fase móvel foi composta por água ácida (2 % de ácido acético, v/v):metanol (50:50, v/v) e injeção de 50 μL de amostra. A zearalenona foi quantificada utilizando para o cálculo, uma curva de calibração analítica. A curva da zearalenona foi feita com padrão contendo as concentrações de 1,75; 2,5; 5,0; 10,0 e 15,0 $\mu\text{L/mL}$. As amostras foram aplicadas em triplicata para confecção da curva.

Os limites de detecção de aflatoxinas considerados foram de 1,0 $\mu\text{g/Kg}$ (85,5 % de recuperação) e para a zearalenona de 10,0 $\mu\text{g/Kg}$ (80 % de recuperação).

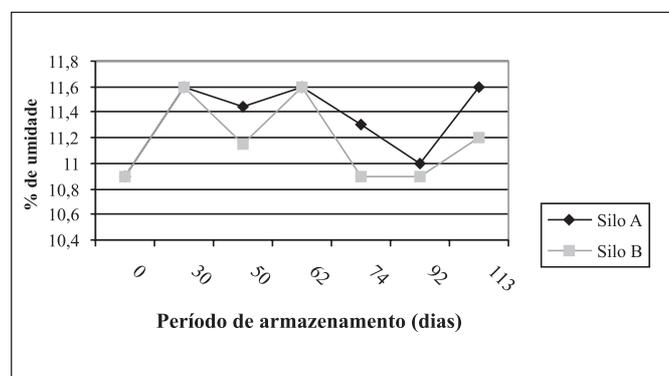


Figura 1. Teor de umidade (%) nos silos A e B em diferentes períodos de armazenamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta o teor de umidade (%) nos silos A e B, em diferentes períodos de armazenagem.

Observou-se que inicialmente a umidade apresentava-se com teores baixos (10,9 a 11,6 %, em ambos os silos), mantendo-se nestes níveis no período de armazenamento (113 dias). As diferenças observadas nos métodos de determinação da umidade pelo sistema higrométrico e secagem em estufa a 105 °C foram considerados desprezíveis, sendo o primeiro normalmente utilizado como método rápido de controle *in loco* nos silos.

Recomenda-se para o milho, teores de umidade na colheita de 24 a 32 % e no armazenamento de 13 a 14 % (sem risco de deterioração por um ano) e de 12 % por um período superior a 1 ano. Os fungos necessitam de uma umidade relativa de, pelo menos, 65 % o que corresponde a uma taxa de equilíbrio de umidade de 13 % no grão de cereal e eles crescem com temperaturas entre 10 e 40°C³.

As Figuras 2, 3 e 4 apresentam o crescimento (%) dos fungos *A. flavus*, *F. roseum* e *Penicillium sp* em amostras de grãos de milho nos silos A e B durante o período de armazenamento, respectivamente.

O *A. flavus* (Figura 2) apresentou variação de 30 a 98 % de crescimento, sendo que as médias do silo A diferem estatisticamente ($p < 0,01$) em relação ao silo B nos períodos de armazenamento, o que também é válido para a média global (38,71 \pm 8,73 no silo A e 76,85 \pm 14,78 no silo B). Sendo concordante com os resultados obtidos por Rosseto et al.²⁰ em grãos de amendoim armazenados, os quais constataram que, independentemente da amostragem, não houve diferença de porcentagem de espécies do grupo *A. flavus* nas avaliações realizadas aos 12 e 18 meses de armazenamento.

Alguns trabalhos com grãos de milho armazenados e subprodutos alimentícios mostram a presença de *Aspergillus sp* como o maior contaminante destes produtos^{1,21,22} ainda que em outros trabalhos a maior incidência tenha sido de

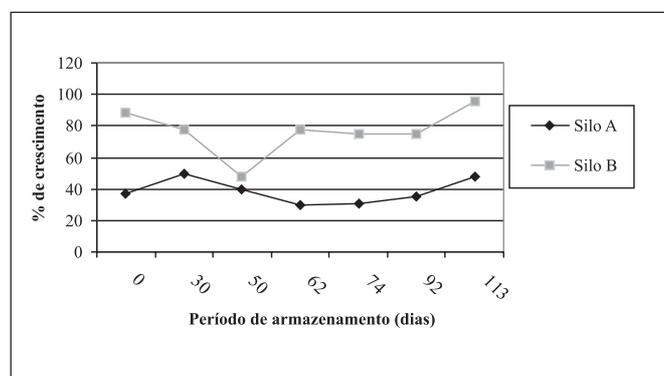


Figura 2. Crescimento (%) de *A. flavus* em amostras de milho, nos silos A e B em diferentes períodos de armazenagem.

Fusarium^{3,4,12,23-26}. Muitas das amostras contaminadas por fungos do gênero *Aspergillus* estavam também contaminadas por insetos. Uma população de insetos dentro da massa de grãos, se não for controlada a tempo, pode criar condições de umidade e temperatura localizadas que estimulem o rápido desenvolvimento fúngico, podendo ocorrer deterioração da massa de grãos e produção de micotoxinas^{27,28}.

De acordo com a Figura 3 pode-se notar que a variação de desenvolvimento do *F. roseum* foi menor, de 3 a 30 %, sendo que o máximo de crescimento foi observado aos 92 dias de armazenamento no silo B. A análise de comparação de médias (teste de Tukey) demonstrou que o silo A difere ($p < 0,01$) do silo B, após 92 dias de armazenamento. Embora as médias globais entre os dois silos apresentem diferenças significativas ($p < 0,01$), com teores de $11,7 \pm 6,43$ para o silo A e $16,8 \pm 8,17$ para o silo B, respectivamente.

O *Fusarium* é considerado um fungo de campo, que invade os grãos e sementes durante o amadurecimento e o dano é causado antes da colheita. Entretanto, não se desenvolvem durante o armazenamento, exceto ocasionalmente em grãos de milho armazenados com alto teor de umidade e/ou que foram rehidratados^{3,4}. Os baixos teores de *Fusarium*, em ambos os silos, podem estar relacionados ao fato de que a temperatura de armazenamento manteve-se inferior a 25°C, mas apresentando influência do período de armazenamento. Em grãos de amendoim armazenados, também foi verificado um aumento na incidência de *Fusarium* sp em relação ao período de armazenamento²⁰.

Marcia e Lazzari³ encontraram 97,5 % das amostras de milho em grão, 13,6 % das amostras de grits e 79 % das amostras de fubá infectadas por *Fusarium*, sendo a espécie predominante *F. moniliforme*. Porém no estudo *F. moniliforme* e *F. graminearum* não foram detectados nas amostras de grãos de milho.

Conforme a Figura 4, pode-se observar que o desenvolvimento do *Penicillium* sp demonstrou-se semelhante nos dois silos até os 62 dias de armazenamento. Porém, após

este período o crescimento foi superior no silo B, com diferenças significativas ($p < 0,01$) a partir do 74 dias e atingindo 90 % das amostras aos 113 dias de armazenamento. Enquanto que no silo A, os teores foram de aproximadamente 60 %, embora as médias globais entre os dois silos não apresentem diferenças significativas ($57,4 \% \pm 10,1$ para o silo A e $65,0 \% \pm 17,94$ para o silo B).

As variações na incidência fúngica em relação ao período de armazenamento podem ter ocorrido por diferenças de umidade relativa do ar²⁹, associado à competição dos fungos por substrato^{20,30}.

As diferenças no crescimento dos fungos (*Aspergillus* sp, *Fusarium*, *Penicillium*) não foram causadas pelo teor de umidade dos grãos, pois a mesma manteve-se com teores estáveis e inferiores a 12 % em ambos os silos (Figura 1). Porém ocorreu uma diferença em relação aos silos A e B, sendo que o menor desenvolvimento dos fungos foi apresentado no silo de A, onde a temperatura (13 a 14°C) e aeração (0,05 m³/min.ton) foram mantidas controladas. Os fungos de armazenamento são sensíveis às mudanças de temperatura, crescendo rapidamente a temperaturas ao redor de 30°C. Quando a temperatura estiver abaixo de 15°C o seu desenvolvimento é bastante reduzido, com exceção do *Penicillium* sp (cresce até -5°C). Ainda, o uso eficiente da aeração é um fator decisivo na boa conservação das sementes e grãos²⁸.

Dos diferentes fatores que podem influenciar no crescimento destes fungos como condições climáticas pré-colheita, diferenças genéticas, índice de grãos quebrados, presença de insetos entre outros^{2,6,31}. A utilização de aeração forçada influencia diretamente na manutenção da uniformidade da temperatura e da umidade relativa do ar, auxiliando na redução de crescimento dos fungos. Diferenças de temperatura dentro da massa de grãos causam a transferência de vapor d'água da porção mais quente para a mais fria que pode condensar e fornecer condições para o desenvolvimento dos fungos²⁸. No silo B, onde não havia controle, diferenças momentâneas de temperatura e de umidade podem ter ocorrido,

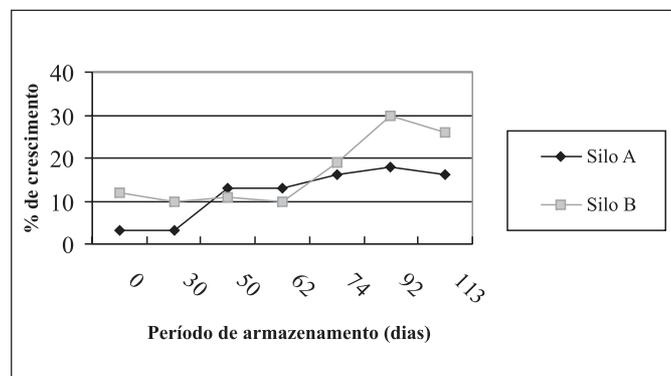


Figura 3. Crescimento (%) de *F. roseum* em amostras de milho dos silos A e B em diferentes períodos de armazenamento.

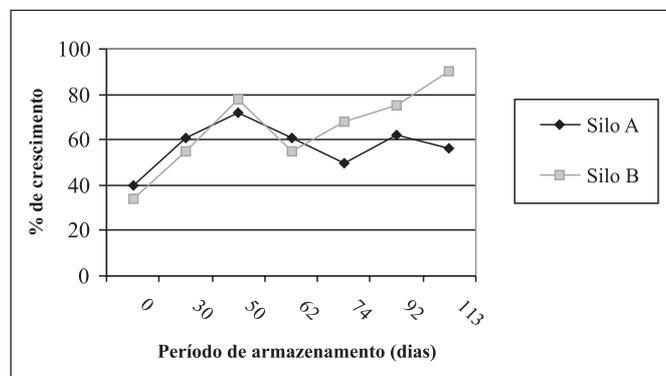


Figura 4. Crescimento (%) de *Penicillium* sp. em amostras de milho dos silos A e B em diferentes períodos de armazenamento.

Tabela 1. Incidência de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e zearalenona (ZEA) em amostras de milho dos silos A e B em diferentes períodos de armazenamento.

| Amostras | Incidência de micotoxinas (µg/kg) | | | | |
|---------------|------------------------------------|---------------|---------------|---------------|-----|
| | Aflatoxina B1 | Aflatoxina B2 | Aflatoxina G1 | Aflatoxina G2 | ZEA |
| Silo A | | | | | |
| 0 dia | 1,0 | ND | ND | ND | ND |
| 113 dias | 1,0 | ND | ND | ND | ND |
| Silo B | | | | | |
| 0 dia | ND | ND | ND | ND | ND |
| 113 dias | ND | ND | ND | ND | ND |

ND: menor que o limite de detecção

Limite de detecção: aflatoxina: 1 µg/kg; zearalenona: 10 µg/kg

ainda que a temperatura ambiente tenha se mantido inferior a 20°C. Embora as temperaturas em ambos os silos tenham ficado abaixo das temperaturas ideais de crescimento dos fungos estudados, quanto menor for a temperatura, menor será o crescimento até um limite de inibição^{28,3}, o que também explica as diferenças de crescimento entre os dois silos de armazenamento.

A incidência de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e zearalenona (ZEA) em amostras de milho dos silos A e B, em diferentes períodos de armazenamento estão demonstrados na Tabela 1.

Observou-se a presença de aflatoxina B₁ somente no silo A, ainda que em concentração no limite de detecção (1,0 µg/kg), sendo que a mesma manteve a incidência ao final do armazenamento. Indicando que esta micotoxina estava presente nos grãos, no início do armazenamento (0 dia). O limite permitido no Brasil e Mercosul para a somatória das aflatoxinas (B₁ + B₂ + G₁ + G₂) é de 20 µg/kg^{32,33}. O não desenvolvimento das micotoxinas podem ser atribuídas às condições ambientais pouco favoráveis, uma vez que a temperatura ideal para a produção da maioria das micotoxinas é superior a 25°C³⁴ e a possibilidade dos fungos isolados não possuem potencial para a síntese destas^{35,36}.

Diversos trabalhos reportam a incidência de micotoxinas em milho em grão e seus derivados. Nicásio et al.¹⁰ analisaram um total de 40 amostras de milho e não foram encontradas aflatoxinas em nenhuma das amostras, estando estes resultados concordantes com os do presente estudo. Pich³⁷ ao analisar 213 produtos derivados de milho comercializados encontraram 17,4 % das amostras com resultados positivos, com uma faixa de contaminação de 3,2 a 25,6 µg/kg de aflatoxina total (B₁+B₂+G₁+G₂). Furlong et al.⁹ e Oliveira et al.¹¹, estudando zearalenona em produtos derivados de milho, encontraram níveis de contaminação médio de 163,0 µg/kg e entre 4,6 e 195,2 µg/kg, respectivamente. De maneira geral, a ocorrência de aflatoxinas, principalmente em amendoim e seus derivados tem sido um problema alarmante, enquanto que a zearalenona tem-se mantido em níveis mais baixos^{12,26}.

CONCLUSÕES

Os fungos *A. flavus*, *F. roseum*, e *Penicillium* sp, foram isolados e identificados, apresentando uma ampla faixa de variação no crescimento, de 30 a 98 %, de 3 a 30 % e de 34 a 90 %, respectivamente. Constatou-se que os maiores crescimentos ocorreram no silo sem controle de temperatura e aeração. A diferença no crescimento dos fungos não foi causada pela umidade, pois a mesma, em ambos os silos, foi inferior a 12 %. A micotoxina detectada no silo A (aflatoxina B₁) encontrava-se presente nos grãos no início do armazenamento (0 dia), mantendo-se nos mesmos limites de detecção ao final do período de armazenamento (113 dias).

AGRADECIMENTOS

À Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul através da FAPERGS e do Pólo de Inovação Tecnológica do Norte do RS, pela concessão de auxílio financeiro à pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Hagstrum DW, Flinn PW. Integrated pest management of stored-grain insects. In: Sauer, DB, editor. Storage of cereal grains and their products. St. Paul: American Association of Cereal Chemists. 1992, 607p.
- Malmann CA, Santurio JM, Wentz I. Aflatoxinas – Aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. *Ciência Rural* 1994; 24(3):635-43.
- Marcia BA, Lazzari FA. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. *Ciênc Tecnol Aliment* 1998; 18(4): 363-7.
- Mills JT. Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* species on cereal seeds. *J Food Prot* 1989; 52:737-42.
- Pozzi CR, Arcaro JRP, Arcaro Junior I, Fagundes H, Corrêa B. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação das fumonisinas. *Ciência Rural* 2002;32(5): 901-7.
- Ono EYS, Sugiura Y, Homechin M, Kamogae M, Vizzoni E, Ueno Y, Hirooka EY. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil. *Mycopathologia* 1999; 147:139-48.

7. Ueno Y. The toxicology of mycotoxins. *CRC Crit Rev Toxicol* 1985; 14:99-132.
8. Gelli DS, Jakabi M, Porto E. Isolamento de *Aspergillus spp* aflatoxigênicos de produtos alimentícios, São Paulo/SP. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1990; 50 (1/2): 329 - 33.
9. Furlong EB, Soares LAS, Vieira AP, Dadalt G. Aflatoxinas, ocratoxina e zearalenona em alimentos da região sul do Rio Grande do Sul. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1999; 58: 105-11.
10. Nicácio MAS, Prado G, Linardi VR. Determinação de aflatoxina e identificação da microbiota fúngica em milho (*Zea mays L.*) pós colheita. *Arq Biol Tecnol* 1995; 38:851-7.
11. Oliveira MS, Prado G, Abrantes FM, Santos LG, Veloso T. Incidência de aflatoxinas, desoxinivalenol e zearalenona em produtos comercializados em cidades do estado de Minas Gerais no período de 1998 - 2000. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2002; 61(1): 1-6
12. Pozzi CR, Corrêa B, Gambale W, Paula CR, Chacon-Reche NO, Meirelles MCA. Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxin occurrence. *Food Addit Contam* 1995; 12:313-9.
13. Prado G, Oliveira MS, Ferreira SO. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim comercializado na região metropolitana de Belo Horizonte, - MG. In: XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 15-17 julho, 1998. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1998, CD-ROM, cbcta 108.
14. São Paulo. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3ª ed. São Paulo, 1985. p.125-6.
15. Christensen CM, Meronuck RA, editors. Quality maintenance in stored grains and seeds. Minnesota: University of MN Press, 1986, 150 p.
16. Silveira VD, editor. Micologia. 5 ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1981. 332p.
17. Soares LM, Rodriguez-Amaya DB. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in Brazilian foods by using multi-toxin layer chromatographic methods. *J Assoc Off Anal Chem* 1989; 73:22-6.
18. Gimeno A. Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin and penitrem A. *J Assoc Off Anal Chem* 1979; 62:579-85.
19. Visconti A, Pascale M. Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 1998; 815:133-40.
20. Rosseto CAV, Silva OF, Araújo AES. Influência da calagem, da época de colheita e da secagem na incidência de fungos e aflatoxinas em grãos de amendoim armazenados. *Ciência Rural* 2005; 35(2):309-15.
21. Abarca ML, Bragulat MR, Castellá G, Cabañes FJ. Mycoflora and aflatoxin - producing strains in animal mixed feeds. *J Food Prot* 1994; 57(3): 256-8.
22. Asevedo IG, Gambale W, Corrêa B, Paula CR, Almeida RMA, Souza VM. Mycoflora and aflatoxigenic species of *Aspergillus spp.* Isolated from stored maize. *Rev Microbiol* 1994; 25(1):46-50.
23. Bottalico A, Logrieco A, Ritieni A, Moretti A, Randazzo G, Corda PA. Beauvericin and fumonisin B1 in preharvest *Fusarium moniliforme* maize ear rot in Sardinia. *Food Addit Contam* 1995; 12(4):599-607.
24. Castro MFP, Soares LMV, Furlani RPZ. Mycoflora, aflatoxigenic species and mycotoxins in freshly harvested corn (*Zea mays L.*): a preliminary study. *Rev Microbiol* 1995; 26(4):289-95.
25. Corda P. Beauvericin and fumonisin B1 in preharvest *Fusarium moniliforme* maize ear rot in Sardinia. *Food Addit Contam* 1995; 12(4):599-607..
26. Rodríguez-Amaya DB, Sabino M. Mycotoxin research in Brazil: The last decade in review. *Braz J Microbiol* 2002; 33:1-11.
27. Blank, G, Goswami N, Madrid F, Marquardt RR, Frohlich AA. Evaluation of *Tribolium castaneum* (herbst) excreta on ochratoxin production in stored wheat. *J Stored Prod. Res* 1995; 31(2): 151-5.
28. Lázari FA, editor. Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações. Curitiba, Edição do autor, 1993, 140p.
29. Dhingra OD, Coelho Neto RA. Micotoxinas em grãos. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 1998; 6(1):49-101.
30. Gurjão ACO. Qualidade fisiológica, nutricional e sanitária de sementes de amendoim (*Arachis hypogaea L.*) produzidas no semi-árido nordestino. [Dissertação de Mestrado]. João Pessoa, Paraíba: UFPB, 1995.
31. Ramakrishna Y, Ramesh VB, Vasanthi S. Natural occurrence of mycotoxins in staple foods in Índia. *J Agric Food Chem* 1990; 38:1857-9.
32. Brasil. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria n. 183 de 21 de março de 1996. Regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos admissíveis no leite, amendoim e milho.
33. Silva LC. Fungos e Micotoxinas em Grãos Armazenados: Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 12 jun 2000. [acesso 09 nov 2004]. Disponível em: <http://www.unioeste.br/agais/fungos.html>.
34. Seizi Oga, editor. Fundamentos de toxicologia. São Paulo: Ed. Atheneu, 1996. p. 463-71.
35. Farias AX, Robbs CF, Bittencourt AM, Andersen PM, Corrêa TBS. Contaminação endógena por *Aspergillus spp.* em milho pós-colheita no Estado do Paraná. *Pesq Agropec Bras* 35(3):617-21, 2000.
36. Ranjan KS, Sinha AK. Occurrence of mycotoxigenic fungi and mycotoxins in animal feed from Bihar, Índia. *J Sci Food Agric* 1991; 56:39-47.
37. Pich PH. Detecção de aflatoxinas em produtos derivados de milho comercializados na região de Porto Alegre [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre, Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.