

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**Efeitos da fosfina no crescimento de
Aspergillus flavus Link e na produção de
aflatoxinas em milho (*Zea mays*, L.)
armazenado com elevados teores de umidade**

Maria Fernanda Penteado Moretzsohn de Castro

Orientador: Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do
título de Doutor em Tecnologia de Alimentos

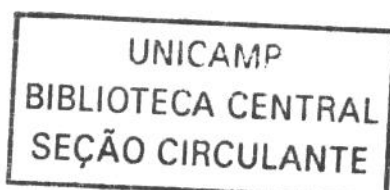
PARECER

Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida
por **Maria Fernanda Penteado
Moretzsohn de Castro**
aprovada pela Comissão
Julgadora em 18 de fevereiro de
2003.

Campinas, SP
Fevereiro, 2003

Campinas, 18 de fevereiro de 2003.


Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas
Leitão
Presidente da Banca



UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
C279e
V EX
TOMBO BC/ 52728
PROC 16-229/03
C D X
PREÇO R\$ 11,00
DATA 13/03/03
Nº CPD

CM001B1017-9

BIB ID 284937

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C279e Castro, Maria Fernanda Penteado Moretzsohn de
Efeitos da fosfina no crescimento de *Aspergillus flavus* Link e
na produção de aflatoxinas em milho (*Zea mays*, L.) armazenado
com elevados teores de umidade / Maria Fernanda Penteado
Moretzsohn de Castro. -- Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Mauro Faber de Freitas Leitão
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1.Milho. 2.Fosfina. 3.*Aspergillus flavus* - Controle.
4.Aflatoxina - Controle. I.Leitão, Mauro Faber de Freitas.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III. Título.

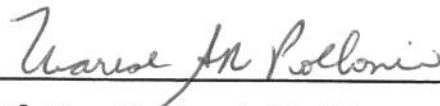
BANCA EXAMINADORA



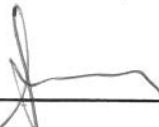
Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão
(Orientador)



Prof. Dr. Benedito Corrêa
(Membro)



Profª. Dra. Marise A. Rodrigues Pollonio
(Membro)



Prof. Dr. Arnaldo Yoshitretu Kuaye
(Membro)



Dr. Flávio Luís Schmidt
(Membro)

Dra. Myrna Sabino
(Membro)

Profª. Dra. Hilary Castle de Menezes
(Membro)

Aos meus filhos André, Tiago e Júlia,
ao meu marido, Paulo
e aos meus pais, Ariovaldo e Nazira

"Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,
mas lutamos para fazê-lo. Não somos o que
deveríamos ser, não somos o que iremos ser mas,
graças a Deus, não somos mais o que éramos"

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pela força e proteção;
- Ao Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão pela confiança, amizade e orientação;
- À FAPESP- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro ao projeto;
- Ao colega e químico do Centro de Química e Nutrição Aplicada do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Dr. Jorge José do Vale Oliveira, pelo auxílio nas análises de fosfina com o cromatógrafo gasoso;
- À Prof^ª. Dra. Neura Bragagnolo, do Departamento de Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, pela orientação na otimização da metodologia para determinação de ergosterol por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Ao Prof. Dr. Mauro de Carvalho, do Departamento de Física Aplicada da Faculdade de Física da UNICAMP, que nos cedeu gentilmente a fosfina padrão;
- À Pesquisadora Margarida Kikuta Barbieri, do Laboratório de Análises Físicas e Sensoriais do ITAL, pela concessão do uso das instalações e gases do LAFISE, para as análises de fosfina;
- Ao Pesquisador Katume Yotsuyanagi, do Laboratório de Análises Físicas e Sensoriais do ITAL, pelo auxílio na análise estatística dos dados;
- À Dra. Marta Taniwaki, da Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia do ITAL, pela orientação nas análises de aflatoxinas;
- Ao Dr. Keneth Arthur Mills, do Central Science Laboratory do Reino Unido, pelas sugestões e orientação nas análises de fosfina;
- A todos os colegas e funcionários da Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia do ITAL, pelo coleguismo e incentivo;
- À minha irmã Ana Lúcia, pelo apoio constante;

- Às estagiárias Eliane Salvadego Anichiário, Camila Velludo Molina e Cláudia Aoki pelo auxílio nas análises do experimento;
- A Taíssa, Audrey e Gustavo pela colaboração “na retaguarda”;
- Aos meus amigos Sílvia Valentini, Flávio Schmidt, Ivânia Athié e Jorge Oliveira pelo incentivo e apoio nos momentos mais difíceis;
- Aos membros da banca examinadora, pelas correções e sugestões apresentadas.

ÍNDICE GERAL

RESUMO GERAL	1
GENERAL SUMMARY	3
INTRODUÇÃO	5
CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
1. MILHO	8
2. <i>ASPERGILLUS FLAVUS</i> E AFLATOXINAS	9
3. OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS EM MILHO E SEUS PRODUTOS NO BRASIL.....	11
4. CONDIÇÕES PARA O CRESCIMENTO DE <i>A. FLAVUS</i> E PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS EM MILHO.....	15
5. TÉCNICAS DE CONTROLE DE FUNGOS E MICOTOXINAS EM GRÃOS	16
6. FOSFINA.....	17
6.1. Efeitos da fosfina.....	19
6.1.1. Sobre fungos em culturas puras	19
6.1.2. No crescimento de fungos em produtos armazenados	20
6.1.3. No controle de aflatoxinas.....	22
6.1.4. Sobre fungos e aflatoxinas em fumigações comerciais	22
7. ERGOSTEROL	24
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
CAPÍTULO 2: DETERMINAÇÃO DE ERGOSTEROL EM MILHO EM GRÃOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO FÚNGICA	38
RESUMO.....	38
SUMMARY	40
1. INTRODUÇÃO	42
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1. Material	43
2.2. Métodos	44
2.2.1. Determinação de ergosterol.....	44
2.2.2. Análises micológicas.....	46
2.2.3. Análises de aflatoxinas	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1. Determinação do ergosterol.....	47
3.2. Precisão e exatidão do método para determinação de ergosterol.....	49
3.3. Teores de ergosterol em milho em grãos com diferentes níveis de contaminação	50
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

CAPÍTULO 3: EFFECTS OF PHOSPHINE ON THE GROWTH OF <i>ASPERGILLUS FLAVUS</i> AND AFLATOXIN PRODUCTION IN CORN GRAINS STORED AT HIGH MOISTURE CONTENTS....	56
SUMMARY	56
RESUMO	57
INTRODUCTION	58
MATERIALS AND METHODS	59
Raw material	59
Source of phosphine	60
Selection of the toxigenic strain of <i>Aspergillus flavus</i>	60
Experimental designs	60
Analyses	62
RESULTS AND DISCUSSION	64
Fungal analyses	64
Aflatoxin analyses	67
DISCUSSION	69
Practical considerations	69
CONCLUSIONS	70
REFERENCES	71
CAPÍTULO 4: FUNGI CONTROL BY PHOSPHINE FUMIGATION IN HIGH MOISTURE CORN..	74
SUMMARY	74
RESUMO	75
INTRODUCTION	76
MATERIALS AND METHODS	77
Raw material	77
Phosphine	78
Experimental design and statistical analyses	78
Analyses	80
RESULTS AND DISCUSSION	82
Fungal and ergosterol analyses	82
Aflatoxin analyses	89
DISCUSSION	91
REFERENCES	92
CAPÍTULO 5: THE RELATIONSHIP BETWEEN PHOSPHINE SORPTION AND FUNGAL CONTROL IN HIGH MOISTURE CORN GRAINS	96
SUMMARY	96
RESUMO	97

1. INTRODUCTION.....	98
2. MATERIALS AND METHODS	99
2.1. Raw material	99
2.2. Phosphine	99
2.3. Inoculation with an <i>Aspergillus flavus</i> strain.....	100
2.4. Experimental design and statistical analyses	100
2.5. Analyses.....	102
2.5.1. Water activity and moisture content	102
2.5.2. Phosphine concentration.....	102
2.5.3. Fungal analyses	103
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	103
3.1. Phosphine standard curve	103
3.2. Fungal and phosphine analyses	105
4. CONCLUSION	113
5. REFERENCES.....	113
CAPÍTULO 6: SORÇÃO DE FOSFINA E AVALIAÇÃO DOS SEUS NÍVEIS RESIDUAIS EM MILHO EM GRÃOS COM ELEVADO TEOR DE UMIDADE	117
RESUMO.....	117
SUMMARY	118
1. INTRODUÇÃO	119
2. METODOLOGIA	120
2.1 Material	120
2.2. Planejamento Experimental.....	120
2.3. Análise de resíduos de fosfina.....	122
A. Padrão de fosfina e solução de nitrato de prata	122
B. Sistema coletor de fosfina (SCF) e tubo de diluição de fosfina (TDF)	122
C. Curva-padrão de fosfina	123
D. Determinação do resíduo de fosfina em milho	124
E. Determinação dos níveis de sorção de fosfina em milho	125
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	125
3.1. Sorção de fosfina	125
3.2 Resíduos de fosfina em milho.....	128
4. CONCLUSÕES	131
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
ANEXOS	135

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Propriedades químicas das aflatoxinas	11
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Taxas de recuperação do ergosterol pelo método otimizado.....	49
Tabela 2. Repetibilidade do método para determinação de ergosterol por CLAE	50
Tabela 3. Percentagem de grãos infectados por fungos e teor de ergosterol nas amostras de milho recém- colhidas da variedade Taiúba e do híbrido Cargil 606.	51
Tabela 4. Percentagem de grãos infectados por fungos e contagem de bolores e leveduras (log UFC/g) detectados sobre o DG18, teor de ergosterol e de aflatoxinas nas amostras de milho Taiúba com 0,87 e 0,95 de Aa inoculadas com <i>A. flavus</i> e armazenadas por 3 e 12 dias. ...	52

CAPÍTULO 3

Table 1. Experimental design.....	61
Table 2. Fungal analyses results.	64
Table 3. Models and determinant coefficients for the responses studied.....	65

CAPÍTULO 4

Table 1. Surface Response Methodology design	79
Table 2. Colony forming units (log), infected grains (%) and ergosterol contents ($\mu\text{g/g}$) in corn samples with different water activities submitted to different fumigation treatments.....	83
Table 3. Models and determination coefficients (r^2) for the responses studied.....	85

CAPÍTULO 5

Table 1. Response Surface Methodology design	101
Table 2. Areas obtained for the phosphine concentrations	104
Table 3. Percentage of grains internally infected by fungi and by <i>Aspergillus flavus</i> and phosphine sorption (g m^{-3}) in corn grains stored with different water activities submitted to different fumigation treatments.....	105
Table 4. Models and determination coefficients (r^2) for the responses studied.....	106

CAPÍTULO 6

Tabela 1. Delineamento rotacional de segunda ordem com 3 fatores e 6 repetições no ponto central (Superfície de Resposta).....	121
Tabela 2. Sorção e resíduos de fosfina nas amostras analisadas.....	126
Tabela 3. Modelo matemático para sorção de fosfina.....	127
Tabela 4: Análise de variância para sorção de fosfina	127
Tabela 5. Adição e recuperação de fosfina em milho testemunha.....	130

ANEXO

Tabela1: Equações de regressão e coeficientes de determinação obtidos para as curvas de adsorção e dessorção.....	135
---	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Colônias de <i>Aspergillus flavus</i> Link no meio de cultura CZAPEK ágar.....	9
Figura 2. Estruturas químicas das aflatoxinas.....	10

CAPÍTULO 2

Figura 1. Fluxograma das etapas de extração do ergosterol.....	45
Figura 2. Cromatograma e espectro de absorbância no U.V. característico do ergosterol.....	48

CAPÍTULO 3

Figure 1. Response surfaces for percentage of grains internally infected by <i>Aspergillus flavus</i> detected on AFPA agar medium as a function of exposure time and phosphine concentration with water activity fixed at 0.89, 0.92 and 0.95 (equivalent to moisture contents of 16.2%, 19.2% and 21.6%, w.b.).....	66
Figure 2. Aflatoxin B ₁ (µg/kg) in corn grains at 0.92a _w and exposed to 0.05, 0.1 and 0.2g m ⁻³ of phosphine for 8 and 15 days.....	68
Figure 3. Aflatoxin B ₂ (µg/kg) in corn grains at 0.92a _w and exposed to 0.05, 0.1 and 0.2g m ⁻³ of phosphine for 8 and 15 days.....	68
Figure 4. Aflatoxin B ₁ (µg/kg) in corn grains at 0.95a _w and exposed to 0.05, 0.1 and 0.2g m ⁻³ of phosphine for 8 and 15 days.....	68
Figure 5. Aflatoxin B ₂ (µg/kg) in corn grains stored at 0.95a _w and exposed to 0.05, 0.1 and 0.2g m ⁻³ of phosphine for 8 and 15 days.....	68

CAPÍTULO 4

Figura 1A. Corn with extensive growth of yeasts and yeast-like moulds on the surface.....	84
Figura 1B. Corn fumigated with phosphine.....	84
Figure 2. Response surfaces for percentage of corn grains internally infected by fungi on DG18 agar medium as a function of exposure time and phosphine concentration with water activities fixed at 0.89, 0.92 and 0.95 water activity (equivalent to moisture contents of 16.2%, 19.2% and 21.6%, w.b.).....	86
Figure 3. Response surfaces for colony forming units (cfu log) on DG18 agar medium as a function of exposure time and phosphine concentration in corn grains with water activities fixed at 0.89, 0.92 and 0.95 (equivalent to moisture contents of 16.2%, 19.2% and 21.6%, w.b.).....	88
Figure 4. Response surfaces for ergosterol contents (µg/g) as a function of exposure time and phosphine concentration in corn grains with water activities fixed at 0.89, 0.92 and 0.95 (equivalent to moisture contents of 16.2%, 19.2% and 21.6%, w.b.).....	90

CAPÍTULO 5

Figura 1. Phosphine standard curve 104

Figure 2. Response surfaces for phosphine sorption, percentage of grains internally infected by fungi and by *Aspergillus flavus* as a function of exposure time and phosphine concentration in corn grains at 0.89 a_w 108

Figure 3. Response surfaces for phosphine sorption, percentage of grains internally infected by fungi and by *Aspergillus flavus* as a function of exposure time and phosphine concentration in corn grains at 0.92 a_w 110

Figure 4. Response surfaces for phosphine sorption, percentage of grains internally infected by fungi and by *Aspergillus flavus* as a function of exposure time and phosphine concentration in corn grains at 0.95 a_w 112

CAPÍTULO 6

Figura 1. Sistema coletor de fosfina (SCF) e tubo de diluição de fosfina (TDF). 123

Figura 2. Curva padrão de fosfina..... 124

Figura 3. Superfícies de resposta para sorção em função do tempo de exposição e concentração de fosfina em milho em grãos com atividade de água de 0,89; 0,92 e 0,95 129

RESUMO GERAL

CASTRO, M.F.P.M. de; LEITÃO, M.F.F. **Efeitos da fosfina no crescimento de *Aspergillus flavus* Link (*Zea mays*, L.) e na produção de aflatoxinas em milho armazenado com elevados teores de umidade.** Campinas: FEA, UNICAMP, 2003. Tese (Doutorado) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2003.

As condições de clima tropical que prevalecem durante a maior parte do ano em nosso país, favorecem o crescimento de fungos e produção de micotoxinas, principalmente quando o produto recém-colhido permanece com elevado teor de umidade aguardando a sua secagem. Essa situação (produto úmido) pode ocorrer quando a safra coincide com períodos chuvosos do ano, dificultando ou mesmo impedindo a secagem natural no campo. A infra-estrutura para secagem artificial dos grãos muitas vezes é inexistente ou aquém da necessária. O crescimento fúngico também pode ocorrer quando os grãos são reumidecidos durante o armazenamento ou o transporte em navios para exportação.

O milho é o principal cereal cultivado em nosso país, tendo alcançado uma produção média de 35 milhões de toneladas nas safras de 2001/2002 (CONAB, 2002) e aquele que no mundo, tem apresentado maiores problemas com micotoxinas. Dentre essas, merecem destaque as aflatoxinas, devido à sua elevada toxicidade e potencial carcinogênico e porque as principais espécies produtoras dessas micotoxinas (*Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*) estão adaptadas e ocorrem com frequência em nossas condições climáticas.

A fosfina, fumigante largamente utilizado no controle de insetos de grãos armazenados, tem se apresentado como uma alternativa promissora para o controle de fungos e micotoxinas em grãos com elevado teor de umidade. Apresenta ainda como vantagens a sua facilidade de aplicação, disponibilidade comercial e o fato de praticamente não deixar resíduos no produto.

O principal objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos da fosfina no crescimento de *Aspergillus flavus* e produção de aflatoxinas em milho armazenado com elevados teores de umidade. Para essa pesquisa foram utilizadas amostras previamente inoculadas com uma cepa toxigênica de *A. flavus*. O efeito concomitante de atividades de água de 0,85 a 0,98 (equivalente a conteúdos de umidade de 15,3% a 24,5%, b.u.), concentrações de fosfina de 0 a 4g m⁻³ e períodos de exposição de 1 a 15 dias ao fumigante foi verificado utilizando-se a Metodologia da Superfície de Resposta. Análises de teor de umidade, atividade de água, micológicas, ergosterol, aflatoxinas e resíduo de fosfina foram realizadas nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos.

Os resultados indicaram que a concentração de fosfina foi mais relevante do que o período de exposição para o controle de *Aspergillus flavus*. Com o aumento da atividade de água dos grãos as concentrações do fumigante também devem ser aumentadas para o controle daquela espécie fúngica. Em relação à produção de aflatoxinas, uma concentração de fosfina de 0,2g m⁻³ evitou a produção das aflatoxinas B₁ e B₂ em milho com 0,92 e 0,95 de atividade de água (equivalente a 19,2% e 21,6%, b.u.) estocado por 8 e 15 dias.

Com base nos resultados alcançados, concluímos que a fosfina pode ser uma alternativa para o controle de *Aspergillus flavus*, bem como, para evitar a produção de aflatoxinas B₁ e B₂ em milho com elevados teores de umidade, armazenado por até 15 dias.

GENERAL SUMMARY

The tropical weather conditions that prevail during most part of the year in our country favour fungal growth and the production of mycotoxins, mainly when the freshly harvested corn is kept at high moisture content while waiting for drying. This situation (wet product), can occur when the harvest season coincides with the rainy season of the year, making it difficult to achieve natural drying in the field. The infra-structure for the artificial drying of the grains either does not exist or the capacity is insufficient to meet the demand. Fungal growth can also occur when the grains are re-wetted during storage or transported by ship for exporting.

Corn is the main cereal grown in our country. The production in the 2001/2002 harvest was 35 millions tons and this crop has shown the biggest problems with mycotoxins globally. Among mycotoxins, the aflatoxins require attention, due to their high toxigenicity and carcinogenic potential and also because the main aflatoxin-producing species (*Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*) are adapted to and occur frequently in our climatic conditions.

Phosphine, a fumigant widely applied for insect control in stored grain, has been shown to be an alternative for controlling fungi and mycotoxin production in grains with high moisture content. It also has the advantage of easy application, commercial availability and that it leaves no significant chemical residue in the grain.

The main objective of the present study was to verify the effects of phosphine on the growth of *Aspergillus flavus* and on aflatoxin production in corn stored at high moisture content. For this study, samples were previously inoculated with an *Aspergillus flavus* toxigenic strain. The concomitant effect of water activities from 0.85 to 0.98 (equivalent to moisture content of 15.3% and 24.5%, w.b.), concentrations from 0 to 4g m⁻³ and exposure times from 1 to 15 days to the fumigant was verified by the Surface Response Methodology. Moisture content, water activity, mycological, ergosterol, aflatoxins and phosphine residue analyses were carried out in the samples submitted to the different treatments.

The results indicated that the phosphine concentration was more relevant than the exposure time to the fumigant for the *Aspergillus flavus* control. With the increase in water activity of the grains the fumigant concentrations have also to be increased in order to control this fungi species. In relation to the aflatoxins, a concentration of 0.2g m^{-3} completely avoids aflatoxins B₁ and B₂ production in corn with 0.92 and 0.95 water activities (equivalent to 19.2% and 21.6%, w.b.) stored for 8 and 15 days.

On the basis of the achieved results we concluded that phosphine can be an alternative to control *Aspergillus flavus* growth, as well as, avoiding aflatoxin B₁ and B₂ production in corn stored at high moisture content for up to 15 days.

INTRODUÇÃO

Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por certos fungos que se desenvolvem em produtos agrícolas. Nos cereais, a ocorrência dessas toxinas é freqüente, principalmente em milho. As aflatoxinas, zearalenona, ocratoxina A, os tricotecenos (principalmente T-2, DAS, DON) e mais recentemente as fumonisinas estão entre as micotoxinas que têm sido freqüentemente associadas com esse cereal (ABBAS *et al.*, 1988; MILLS, 1989; SABINO *et al.*, 1989; WIDIASTUTI *et al.*, 1988; SHEPHARD *et al.*, 1996). Dentre essas, as aflatoxinas produzidas, principalmente, pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* têm merecido maior atenção devido ao seu elevado potencial carcinogênico e toxicidade. No Brasil, a ocorrência de aflatoxinas em milho tem sido verificada por diversos autores (SCUSSEL, RODRIGUES-AMAYA, DA SILVA, 1986; SABINO, 1980; VALE, 1992; SANTÚRIO *et al.*, 1992; HENNIGEN & DICK, 1992). Sabe-se que a produção de aflatoxinas por cepas de *A. flavus* ocorre devido à secagem e armazenagem inadequadas do produto. No caso do milho, teores de umidade acima de 17,5% e temperaturas superiores a 13°C, favorecem a formação de aflatoxinas (REHANA & BASAPPA, 1990). A atividade de água mínima para germinação e crescimento de *A. flavus* é 0,82 a 25°C, 0,81 a 30°C e 0,80 a 37°C (PITT & MISCAMBLE, 1995). Os dados disponíveis sobre a influência da atividade de água na produção de aflatoxinas por *A. flavus* são escassos e sugerem um limite próximo de 0,86 (PITT, 1995).

Em nosso País, durante a maior parte do ano, prevalecem condições de clima úmido e quente que propiciam o desenvolvimento fúngico e a produção de micotoxinas. O período da safra, muitas vezes, coincide com épocas chuvosas do ano, o que dificulta ou mesmo impede a secagem natural do produto logo após a colheita até os níveis considerados seguros para a estocagem. A infra-estrutura para secagem artificial do produto é freqüentemente inexistente ou aquém da necessária. Nessas situações, os grãos permanecem temporariamente armazenados sob condições críticas, que favorecem o desenvolvimento de fungos e a contaminação do produto por micotoxinas, tornando-o impróprio para o

consumo humano ou animal. Alternativas à secagem, tais como o resfriamento do produto e tratamento com ácido propiônico são dispendiosas ou inadequadas a alimentos destinados ao consumo humano. O crescimento fúngico também pode ocorrer quando os grãos são reumedecidos durante o armazenamento ou transporte em navios.

O milho é o principal cereal cultivado no Brasil que é o terceiro produtor mundial desse grão, após a China e os Estados Unidos, portanto, torna-se de extrema importância o desenvolvimento de técnicas que controlem e evitem a produção de aflatoxinas durante o período em que seu teor de umidade permanece ou se torna elevado. A fosfina, fumigante amplamente utilizado para o controle de insetos em grãos armazenados, principalmente nas regiões tropicais, tem se revelado como uma alternativa promissora para o controle de fungos e micotoxinas em grãos. Apresenta como vantagens a facilidade de aplicação, o baixo custo, a disponibilidade comercial e o fato de praticamente não deixar resíduos no produto. No Brasil, a concentração recomendada para controlar os insetos é de 2 a 3g m⁻³, com um período de exposição de 120 horas.

Com base nessas considerações, esta pesquisa foi conduzida com os seguintes objetivos:

- Otimizar uma metodologia para determinação de ergosterol por cromatografia líquida de alta eficiência em milho em grãos.
- Verificar os efeitos da fosfina no crescimento de *A. flavus* em milho em grãos armazenado com atividade de água de 0,85 a 0,98 (equivalente a conteúdos de umidade de 15,3% a 24,5%, b.u.), quando aplicada em concentrações de 0 a 4g m⁻³ por períodos de exposição de 1 a 15 dias;
- Investigar os efeitos da fosfina no crescimento de fungos em milho armazenado com elevados teores de umidade, nas condições anteriormente mencionadas, comparando o método do plaqueamento direto dos grãos, da diluição em série e do ergosterol;
- Verificar a existência de uma possível relação entre o crescimento fúngico e a sorção de fosfina e, mais especificamente, entre o controle de *A. flavus* e a sorção de fosfina, em milho fumigado nas condições estudadas.

- Verificar os níveis de sorção e avaliar os resíduos desse fumigante em milho em grãos com elevado teor de umidade.

O presente trabalho consta de seis capítulos, sendo que o Capítulo 1, referente à revisão bibliográfica, seguiu as normas para redação de tese da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP e destinou-se a dar embasamento teórico aos estudos desenvolvidos, apresentados nos capítulos 2, 3, 4, 5 e 6 na forma de artigos científicos.

O artigo referente ao Capítulo 2, intitulado “Determinação de ergosterol em milho em grãos com diferentes níveis de contaminação fúngica”, foi redigido conforme as normas da *Brazilian Journal of Food Technology* (BJFT).

O Capítulo 3, referente ao artigo intitulado “*Effects of phosphine on the growth of Aspergillus flavus and aflatoxin production in corn grains stored at high moisture contents*”, foi redigido conforme as normas do *Journal of Stored Products* e publicado no “*Proceedings of the International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation*”, realizado em Fresno, Califórnia, USA, no período de 29/10/2000 a 03/11/2000.

O artigo “*Fungi control by phosphine fumigation in high moisture corn*”, referente ao Capítulo 4, foi apresentado na “*International Conference on Stored Product Protection*”, realizado em York, U.K., no período de 24 a 28 de julho de 2002 e será publicado nos *Proceedings* desse evento. Esse artigo foi redigido conforme as normas do *Journal of Stored Products*.

Os Capítulos 5 e 6 referentes aos artigos “*The relationship between phosphine sorption and fungal control in high moisture corn grains*” e “Sorção de fosfina e avaliação dos seus níveis residuais em milho em grãos com elevado teor de umidade” foram redigidos conforme as normas da *Brazilian Journal of Food Technology*(BJFT).

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Milho

O milho (*Zea mays*, L.) constitui um dos mais importantes grãos cultivados no mundo, sendo esse o cereal de maior produção no Brasil (35 milhões de toneladas nas safras 2001/2002). A produção brasileira desse grão só é superada pela dos Estados Unidos e China (CONAB, 2002).

O milho é utilizado principalmente para ração animal. Na formulação de rações para aves participa com até 63% e na de suínos com até 75% (NOGUEIRA, NOGUEIRA & TSUNECHIRO, 1987). A suinocultura e a avicultura são responsáveis pela maior parte da utilização dos grãos (41%). O restante da produção divide-se entre a indústria (13,5%), a formulação de rações de outras espécies animais (5,6%) e produção de sementes (0,6%). A não-comercialização de 39,3% dos grãos produzidos deve-se, principalmente, ao consumo na propriedade rural, na ordem de 24,7%. O restante dessa não-comercialização encontra escoamento no consumo humano nas grandes cidades (4,4%) e nas perdas durante a colheita e o armazenamento, responsáveis por 9,9% do total produzido no País (PEDROSA & DEZEN, 1991).

A presença de grãos deteriorados por fungos (ardidos/fermentados) e de micotoxinas compromete a qualidade e a segurança desse alimento e dos produtos derivados, e portanto, é um aspecto de suma importância na sua comercialização (KINOSHITA, 2001; MENEGAZZO *et al.*, 2001).

2. *Aspergillus flavus* e aflatoxinas

Aflatoxinas, zearalenona, ocratoxina A, os tricotecenos (principalmente T-2, DAS, DON) e as fumonisinas estão entre as micotoxinas que têm sido freqüentemente associadas com milho (ABBAS *et al.*, 1988; MILLS, 1989; SABINO *et al.*, 1989; WIDIASTUTI *et al.*, 1988, SHEPHARD *et al.*, 1996). Dentre essas, as aflatoxinas, produzidas principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* tem merecido maior atenção devido ao seu elevado potencial carcinogênico e toxicidade.

De acordo com KLICH & PITT (1988) *Aspergillus flavus* Link, principal espécie produtora de aflatoxinas, se distingue das demais espécies do gênero *Aspergillus* principalmente por apresentar colônias verde-amareladas (Figura 1) com conidióforos de parede rugosa, conídios de paredes lisas ou levemente rugosas, medindo de 3 a 6µm em diâmetro. Apesar de estar distribuído mundialmente é predominantemente um fungo tropical ou subtropical aparentemente mais comum em solos cultivados do que não-cultivados. Coloniza vegetação em decomposição, sementes e muitos outros substratos. Tem sido relatado como patógeno de insetos e animais.

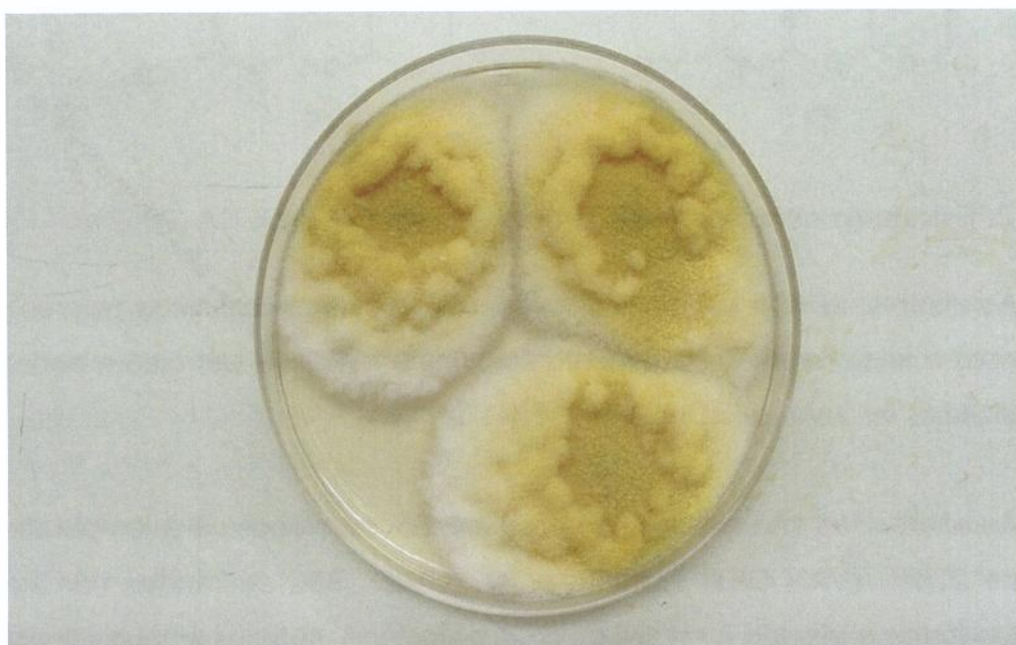


Figura 1. Colônias de *Aspergillus flavus* Link no meio de cultura CZAPEK ágar.

O termo aflatoxina normalmente se refere a um grupo de metabólitos de bisfuranocumarina produzido por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *A. nomius*. São conhecidas 17 substâncias do grupo, entretanto as mais importantes em alimentos são as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ (WYLLIE & MOREHOUSE, 1977; PITT & HOCKING, 1999) (Figura 2). As quatro substâncias são distinguidas com base nas suas fluorescências, ou seja, a aflatoxina B₁ (AFB₁) e a aflatoxina B₂ (AFB₂) emitem fluorescência azul (Blue) e a aflatoxina G₁ (AFG₁) e a aflatoxina G₂ (AFG₂) emitem fluorescência verde (Green) (PITT & HOCKING, 1999).

AFLATOXINAS

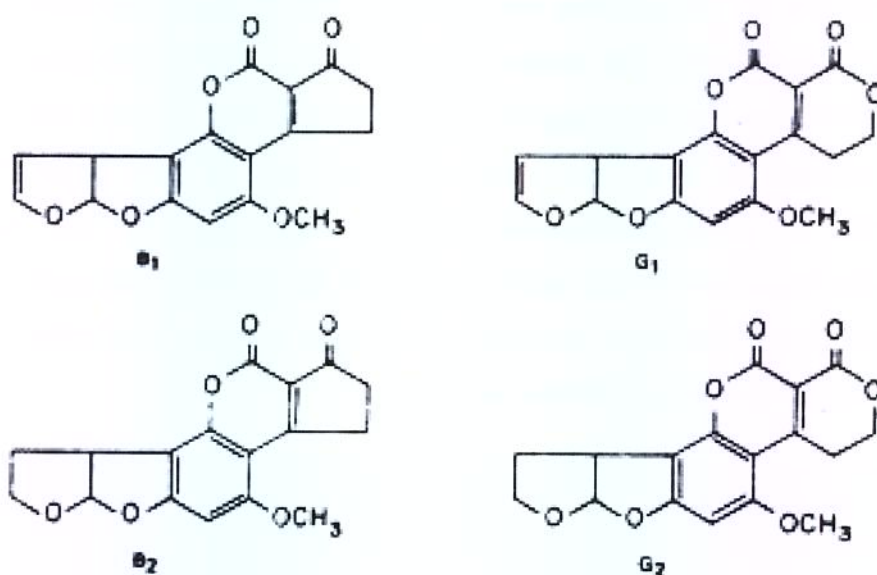


Figura 2. Estruturas químicas das aflatoxinas. Fonte: FONSECA (2002).

As aflatoxinas são bastante solúveis em solventes orgânicos polares como clorofórmio e acetona, moderadamente solúveis em éter de petróleo e podem ser recristalizadas facilmente (SCUSSEL, 1984).

As aflatoxinas são estáveis ao calor sendo decompostas à temperatura de cerca de 220°C (VAN DER ZIJDEN *et al.*, 1962). São destruídas por agentes oxidantes fortes e, devido à presença do anel lactona, são susceptíveis à ação de base (MAGOON, VISWANATHAN & VENKITASUBRAMANIAN, 1970).

A Tabela 1 apresenta as propriedades químicas das aflatoxinas.

Tabela 1. Propriedades químicas das aflatoxinas.

Aflatoxina	Fórmula molecular	Peso Molecular	Ponto de Fusão (°C)	Absorção (□) 362-363 nm	Emissão de fluorescência (nm)
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269	21.800	425
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	23.400	425
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	16.100	450
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	21.000	450

Fonte: BUTLER, 1974

A aflatoxina B₁ é um metabólito fúngico altamente tóxico e carcinogênico e desempenha um importante papel na epidemiologia do câncer humano de fígado e outras doenças (PEERS, GILMAN & LINSELL, 1976). De acordo com STOLOFF (1977) as aflatoxinas produzem quatro efeitos distintos: danos agudo ao fígado, cirrose de fígado, indução de tumores e efeitos teratogênicos.

Foi demonstrado, em uma variedade de espécies animais, que a aflatoxina B₁ é o mais potente carcinogênico de fígado que se conhece. A carcinogenicidade em animais é tão elevada que qualquer esforço deve ser feito para monitorar e reduzir os níveis em alimentos humanos (PITT & HOCKING, 1999).

3. Ocorrência de aflatoxinas em milho e seus produtos no Brasil

No Brasil a ocorrência de aflatoxinas em milho vem sendo verificada por diversos autores. PREGNOLATO & SABINO (1969/1970), UBOLDI EIROA & ARCKOLL (1978), UBOLDI EIROA (1979) e PRADO (1983) analisaram entre outros alimentos a farinha de milho, não encontrando aflatoxina em nenhuma das amostras. No entanto, SABINO (1980) analisando vários alimentos, relatou elevados teores de aflatoxinas no grupo “arroz, milho, aveia e trigo”, porém, sem especificar o produto que apresentou a contaminação mais elevada e o teor especificamente alcançado no milho. SCUSSEL (1984) discutindo esse estudo,

comenta que o fato de a maioria dos produtos derivados de milho não terem apresentado aflatoxinas, pode ser explicado pelo uso de milho não contaminado e também pelo tipo de processamento.

SCUSSEL, RODRIGUES-AMAYA & DA SILVA (1986), analisaram amostras de quatro cultivares de milho em três estágios de maturação junto ao campo experimental da UNICAMP e não detectaram a presença de aflatoxinas em nenhuma delas. No mesmo trabalho, os autores também analisaram 83 amostras de milho verde e seus produtos derivados sendo que somente duas amostras de fubá apresentaram contaminação com a aflatoxina B₁ com valores de 14 e 18µg/kg, respectivamente.

Somente a aflatoxina B₁ foi encontrada, em milho, em níveis de 41-2000µg/kg dentre 742 amostras de diversos alimentos, coletados em posto de venda a varejo no Estado de São Paulo e analisados quanto à presença de aflatoxinas, zearalenona e ocratoxina A (FONSECA *et al.*, 1982; 1983).

BALDISSERA *et al.* (1992) verificaram a contaminação por aflatoxinas em 59 amostras de amendoim e 61 de farinha de milho, destinadas ao consumo humano, de 21 marcas diferentes e adquiridas no comércio de Santa Maria - R.S., no período de abril a novembro de 1991. Foram detectadas aflatoxinas em 81,97% das amostras, sendo que somente 6,56% apresentaram valores superiores ao limite de 30µg/kg. A maior concentração de aflatoxinas encontrada na farinha de milho foi de 68µg/kg.

VALE (1992) analisou um total de 70 amostras de milho para pipoca, sendo a maioria procedente do Estado do Ceará e verificou que das 20 amostras analisadas em período chuvoso 30% apresentaram contaminação com a aflatoxina B₁ numa faixa de 22 a 87µg/kg, enquanto das 20 amostras analisadas em período pós-chuvoso 50% estavam contaminadas numa faixa de 43 a

130µg/kg e em período de estiagem das 30 amostras analisadas 25% estavam contaminadas com níveis entre 25 a 53µg/kg.

SANTÚRIO *et al.* (1992) analisaram 519 amostras de rações e grãos coletados de diferentes locais da Região Sul do Brasil no período compreendido entre os anos de 1987 a 1991, dessas 45,86% foram de milho, 31,98% de ração balanceada para o consumo dos animais, principalmente suínos e aves e 22,16% eram de outros alimentos como farelo de arroz, sorgo, farelo de trigo e colza. Das amostras analisadas 28,85% estavam contaminadas por aflatoxinas; 1,73% por ocratoxina A e 4,81% por zearalenona. O nível máximo de contaminação por aflatoxinas foi de 1906µg/kg; de 745µg/kg por ocratoxina A e de 4982µg/kg por zearalenona.

GLORIA, FONSECA & SOUZA (1997) verificaram a ocorrência de aflatoxinas, zearalenona e ocratoxina A e os teores de umidade em milho em uma indústria moageira em São Paulo, em outubro de 1993 (96 amostras), março (106) e agosto de 1994 (90). Somente aflatoxinas foram detectadas: B₁ foi a mais freqüente em 57,3%; 16,0% e 27,7% das amostras, respectivamente. Os níveis encontrados não foram elevados com exceção de 7 amostras que estavam acima de 30µg/kg, que é o limite de tolerância brasileiro do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1996). A média de contaminação com as aflatoxinas B₁+G₁ foi de 14,9µg/kg; 13,9µg/kg, 4,3µg/kg, respectivamente.

ABREU *et al.* (2000) analisaram amostras de milho da região de Bastos-S.P. Das 22 amostras analisadas apenas uma, da cidade de Chapadão do Sul-M.S., apresentou níveis de aflatoxina B₁ acima de 20µg/kg, no entanto, os autores comentam que esses resultados foram devido ao fato do produto ter sofrido uma pré-limpeza e secagem (12% de umidade) condição que contribui para o controle do desenvolvimento fúngico e eventual produção de micotoxinas.

Levantamento realizado, em 1995, pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento do Brasil (MA) mostrou que 260 amostras de milho dentre 264 estavam contaminadas com aflatoxina B₁ (98%) (AMORIM *et al.*, 2000).

CORRÊA *et al.* (2000) monitoraram a qualidade de milho do mercado brasileiro no período de 1991 a 1998. Foram coletadas 600 amostras de diferentes Estados do Brasil (Paraná, Goiás e Mato Grosso do Sul) e de outros dois países do Mercosul (Argentina e Paraguay). Os resultados mostraram que 50,09% das amostras estavam contaminadas com aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂). Cerca de 12,9% desse total apresentou níveis acima de 20µg/kg que é aquele permitido pela Legislação Brasileira (BRASIL, 1977).

MACHINSHI *et al.* (2000) analisaram 110 amostras correspondentes a 52 cultivares de milho durante o cultivo de 97/98. Cinquenta e cinco (55) amostras apresentaram concentração de aflatoxinas acima de 1µg/kg. As concentrações de aflatoxinas variaram de não detectada para 1600µg/kg para AFB₁, não detectada para 192µg/kg para AFB₂, não detectada para 280µg/kg para AFG₁ e não detectada a 69µg/kg de AFG₂.

No Brasil, a presença de aflatoxinas em milho é atualmente regulada pela Resolução n° 274 de 15 de outubro de 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que estabelece o limite de 20µg/kg para a soma das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, e pela Portaria n°183 de 21 de março de 1996, do Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária que estabelece o limite máximo de 20µg/kg, para a somatória das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, acompanhando o que foi estabelecido para os países do Mercosul (BRASIL, 2002; BRASIL, 1996).

4. Condições para o crescimento de *A. flavus* e produção de aflatoxinas em milho

A produção de aflatoxinas por cepas de *A. flavus* ocorre devido à secagem e armazenagem inadequadas do produto. No caso do milho, teores de umidade acima de 17,5% e temperaturas superiores a 13°C favorecem a formação de aflatoxinas (REHANA & BASAPPA, 1990). De acordo com PITT & MISCAMBLE (1995) a atividade de água mínima para germinação e crescimento de *A. flavus* é 0,82 a 25°C; 0,81 a 30°C e 0,80 a 37°C. PITT (1995) comenta que os dados disponíveis sobre a influência da atividade de água na produção de aflatoxinas por *A. flavus* são escassos e sugerem um limite próximo de 0,86.

NORTHOLT, VAN EGMOND & PAULSCH (1977) verificaram que o substrato desempenha um importante papel em relação a limitar a atividade de água para a produção de toxinas. De um modo geral, os estudos mostraram que as aflatoxinas podem ser produzidas em condições de atividade de água e temperatura próximas daquelas mínimas para o crescimento de *Aspergillus flavus*.

BULLERMAN, SCHROEDER & PARK (1984), sem especificar o substrato, comentam que a produção de aflatoxinas é favorecida por temperaturas de 25°C a 30°C e, embora também possa ocorrer abaixo de 8°C-10°C, as quantidades produzidas são menores e o tempo requerido é mais longo.

TRUCKSESS, STOLOFF & MISLIVEC (1988) estudaram o efeito da temperatura, atividade de água e outras espécies de fungos toxigênicos no crescimento de *Aspergillus flavus* e produção de aflatoxinas em milho, "pinto beans" e soja e verificaram com relação ao milho, que a temperatura de 16°C foi extremamente baixa para a produção de aflatoxinas tanto pelas espécies de *A. flavus* inoculadas como pelas naturalmente presentes, embora os fungos fossem capazes de crescer em valor de atividade de água tão baixo quanto 0,80. A produção de aflatoxinas foi essencialmente a mesma a 26 e 32°C com valores de

atividade de água limites na faixa de 0,85 a 0,89. O valor de atividade de água limite para o crescimento fúngico a 26 e 32°C foi de 0,73 para o milho.

Segundo HUNTER (1969), citado por TRUCKSESS, STOLOFF & MISLIVEC (1988), *A. flavus* não cresce sobre o milho armazenado em climas temperados, se o conteúdo de umidade estiver abaixo de 17,5% (equivalente a 0,79 de atividade de água) e para a produção de aflatoxinas em milho a 30°C é necessária uma atividade de água superior a 0,86.

De acordo com NORTHOLT *et al.* (1976) o crescimento ótimo de *A. flavus* na maioria dos substratos ocorre em uma faixa de 29 a 35°C, sendo as temperaturas máximas e mínimas de 43 e 12°C, respectivamente.

5. Técnicas de controle de fungos e micotoxinas em grãos

As técnicas mais estudadas para o controle de fungos e micotoxinas em grãos são a secagem, o resfriamento, o uso de atmosferas modificadas e os inibidores fúngicos (ácido propiônico aplicado na forma pura ou em mistura com ácido acético, isobutílico, formaldeído ou outras substâncias), sendo a secagem o método mais utilizado.

A umidade é o fator determinante para o crescimento fúngico e, portanto, a secagem do produto até níveis de umidade inferiores àqueles mínimos necessários para o desenvolvimento de fungos é um dos métodos de controle mais eficientes. Como o crescimento fúngico pode ocorrer muito vagarosamente acima de 0,70 de *Aa* esse valor representa o nível máximo de atividade de água a que os grãos devem ser secos para se conservarem por um período prolongado de estocagem, o qual corresponde a conteúdos de umidade de 12 a 14% para os grãos amiláceos (ATHIÉ *et al.*, 1998).

O resfriamento dos grãos também previne a proliferação de insetos, mantém a qualidade das sementes durante todo o período de armazenamento, evita a utilização de agrotóxicos para o controle de pragas, mantém a germinação e o vigor no caso de sementes, reduz o custo do armazenamento e permite armazenar grãos com teores de umidade mais elevados (BARRETO, BIANCHI & BIANCHI, 2001).

O uso de atmosferas modificadas para o controle de insetos também tem aplicação quando se visa o controle de fungos, no entanto, muitos fungos de armazenamento são capazes de crescer em baixas pressões parciais de oxigênio e a redução nos níveis de oxigênio disponíveis não é suficiente, freqüentemente, para prevenir o crescimento fúngico, particularmente de grãos com elevados teores de umidade. Níveis elevados de dióxido de carbono são mais inibitórios ao crescimento fúngico, mas outros fatores, tais como a temperatura e o teor de umidade, afetam o nível de inibição exercido pelas atmosferas modificadas. A manutenção de atmosferas modificadas, particularmente aquelas com elevados teores de CO₂, requerem um sistema de armazenamento bem vedado e como tais sistemas não são freqüentemente disponíveis em países tropicais, a fumigação é normalmente utilizada como método de controle de insetos (HOCKING, 1991).

O uso de fungicidas e outros compostos químicos para controle de fungos e de micotoxinas em grãos armazenados e em mistura para rações oferece restrições, devido aos problemas relativos a resíduos ou por ocasionar outros efeitos que tornam o produto impróprio para consumo humano ou animal.

6. Fosfina

O fosfeto de hidrogênio, também conhecido como fosfina (PH₃), é um gás nas Condições Normais de Temperatura e Pressão (CNTP), de densidade 1,2 em relação ao ar atmosférico e que pode ser obtido através da reação química de hidrólise do fosfeto de alumínio ou magnésio. Estes fosfetos estão disponíveis comercialmente na forma de pastilhas de 0,6g e tabletes de 3,0g, sendo que o

fosfeto de alumínio é também encontrado na formulação de sachê de 34g. Nesta última condição, a terça parte de fosfeto é liberada em forma de fosfina pela reação com a umidade do ar.

O controle de insetos no armazenamento de alimentos é realizado principalmente pelo uso de produtos químicos, utilizando-se fumigantes para eliminar infestações de insetos e inseticidas líquidos para prevenir reinfestações destas pragas. Os fumigantes permitidos para uso em grãos armazenados no Brasil são a fosfina (BRASIL, 1985) e o brometo de metila (CH_3Br). Entretanto, como o uso do brometo de metila contribui para destruir a camada de ozônio, existe uma tendência de aumento do uso de fosfina nos próximos anos.

A fosfina possui a habilidade de se difundir rapidamente através de produtos, tais como grãos e farinhas armazenadas, e de ser adsorvida por estes alimentos em pequena quantidade, ao ser comparada com outras substâncias, o que a torna um excelente fumigante para produtos estocados (HESELTINE, 1973). Apresenta como vantagens a facilidade de aplicação, o baixo custo, a disponibilidade comercial e o fato de praticamente não deixar resíduos no produto. A concentração recomendada para o controle de insetos de produtos armazenados é no mínimo de 1g m^{-3} , mas para alcançar essa concentração, na prática, se recomendam 5g m^{-3} em condições relativamente boas de vedação e até 10g m^{-3} se as condições de vedação não forem adequadas. O tempo de exposição varia com a espécie e com a faixa de temperatura, mas a maioria dos insetos são controlados a $20\text{-}30^\circ\text{C}$ em 5 dias (120 horas) (ANON, 1993). No Brasil, a concentração recomendada é de 2 a 3g m^{-3} e um período de exposição de até 120 horas (AGROFIT, 2002). De acordo com NAKAKITA; KATSUMATE; OZAWA (1971), a fosfina é um inibidor das enzimas respiratórias, podendo desse modo também ter algum efeito em fungos.

6.1. Efeitos da fosfina

6.1.1. Sobre fungos em culturas puras

Inibição no crescimento de várias espécies fúngicas em meio de cultura com elevada atividade de água na presença de fosfina foi observada por BAILLY, LEITÃO & CABROL-TELLE (1985) e LEITÃO, SAINT-BLANQUEAT & BAILLY (1987). Esses autores verificaram que a fosfina em uma concentração de $0,3\text{g m}^{-3}$ reduziu o crescimento de culturas puras de várias espécies de *Aspergillus* (medido como peso seco de micélio) que estavam se desenvolvendo em meio líquido, no entanto, a variação nos níveis de inibição de cepa para cepa foi expressiva, atingindo valores de 3,5% (cepa de *E. rubrum*) até 86,5% (cepa de *A. flavus*).

REN *et al.* (1983), utilizando concentrações de fosfina, entre 0,31 e $3,08\text{g m}^{-3}$ por 3, 5 e 10 dias a 30°C , verificaram que *Eurotium amstelodami* era mais sensível à fosfina do que *A. flavus*. A menor concentração de fosfina utilizada inibiu a germinação de *E. amstelodami*, mas *A. flavus* germinou após 10 dias em $0,97\text{g m}^{-3}$ de fosfina. Esse mesmo autor também constatou que a fosfina foi mais efetiva na prevenção do crescimento fúngico, se aplicada em atmosferas com baixo teor de oxigênio ($<1,0\%$).

BAILLY, LEITÃO & CABROL-TELLE (1985) verificaram que houve inibição de várias espécies fúngicas, mantidas por 21 dias, à temperatura ambiente, em uma atmosfera com 1,6 a $2,0\text{g m}^{-3}$. Após o tratamento com fosfina, as culturas foram incubadas a 28°C por 15 dias. Das 100 cepas testadas, 41 foram mortas pelo tratamento com fosfina e 41 inibidas, ou seja, cresceram após remoção da câmara de fumigação. Verificaram que as espécies de *Fusarium* foram as mais resistentes e as cepas de *Penicillium* as mais sensíveis ao tratamento. Das 46 cepas de *Aspergillus* testadas, 9 foram mortas e 31 inibidas pela fosfina. Resultados similares foram relatados por BAILLY *et al.* (1987), utilizando concentrações superiores a $4,3 - 4,9\text{g m}^{-3}$, por um período de até 90 dias.

Entretanto, quatro isolados de *Fusarium* e um único de *Byssoschlamys* testado sobreviveram a uma exposição por 90 dias.

DHARMAPUTRA *et al.* (1991) também verificaram o efeito de diferentes concentrações de fosfina (0,5; 1,5; 2,5; 3,5g m⁻³) no crescimento do micélio, esporulação, germinação dos esporos e produção de aflatoxinas por *A. flavus*. Esses autores verificaram que o tamanho da colônia diminuiu com os aumentos de concentração de fosfina. A inibição do crescimento micelial começou na concentração de 0,5g m⁻³ e para o isolado BIO 17 foi totalmente inibida a 3,5g m⁻³. Os micélios foram inibidos e não mortos pelo tratamento com fosfina, uma vez que, quando incubados em condições normais, após o tratamento ainda foram capazes de crescer. A inibição da esporulação começou na dose 0,5 e 1,5g m⁻³, respectivamente, para os isolados BIO-18 e BIO-17. Com 3,5 g m⁻³ de fosfina nenhuma esporulação ocorreu no isolado BIO-17. A germinação começou a decrescer a 0,5g m⁻³ de fosfina e continuou a diminuir com o aumento da concentração de fosfina. Nos controles (ar), as percentagens de germinação dos esporos dos isolados BIO-17 e BIO-18 foram 59,1% e 52,5%, respectivamente, enquanto a 3,5g m⁻³ de fosfina os valores de germinação foram 2,4% e 2,0%, respectivamente. A germinação dos esporos somente foi inibida pela fosfina, uma vez que os esporos ainda tinham capacidade para germinar, quando incubados sob condições normais, após o tratamento.

6.1.2. No crescimento de fungos em produtos armazenados

Alguns trabalhos, realizados em substratos naturais ou em meios de cultura, indicaram que a fosfina tem um efeito pouco pronunciado em fungos em estado dormente (RAGHUNATHAN & MAJUNIDER, 1969; SINHA, BEREK & WALLACE, 1967; HOCKING & BANKS, 1991a), no entanto, estudos indicaram que a fosfina pode ter efeito promissor no controle de fungos em condições de estocagem nas quais esses estão ativos.

NATARAJAN & BAGYARAJ (1984) observaram alguma redução nos fungos em ervilhas expostas a níveis muito elevados de fosfina (100g m^{-3}), particularmente com 15% de umidade, aproximadamente 0,80 de atividade de água (Aa), o valor mais elevado testado.

HOCKING & BANKS (1991a) inocularam trigo com 0,80 e 0,86 de atividade de água com um fungo comum de armazenamento, *Eurotium chevalieri*, e uma espécie micotoxigênica, *Aspergillus flavus* ou *A. parasiticus*. O trigo foi então exposto a um fluxo de fosfina ($0,1\text{g m}^{-3}$) por duas semanas a 28°C , com amostras controle expostas ao ar sob as mesmas condições; nos grãos submetidos ao tratamento com fosfina o desenvolvimento da maioria dos fungos de armazenamento foi mais lento, embora o fumigante não tenha evitado completamente o crescimento fúngico. Esses autores sugeriram que a fosfina poderia ser útil no retardo da deterioração fúngica em grãos armazenados com conteúdo elevados de umidade (15 a 19% para trigo) por curtos períodos. A fosfina na concentração de $0,1\text{g m}^{-3}$ causou somente um pequeno decréscimo nas populações fúngicas que eram incapazes de crescer nos valores de atividade de água estudados. Esses mesmos autores (HOCKING & BANKS, 1991b) verificaram redução no desenvolvimento de *Aspergillus parasiticus* inoculado em arroz com casca, com atividade de água de 0,92, após exposição dos grãos a $0,1\text{g m}^{-3}$ de fosfina por 14 e 28 dias. Observaram ainda que a fosfina reduziu o desenvolvimento da maioria dos fungos de armazenamento com exceção de *Penicillium* sp. Esses autores sugeriram que concentrações mais elevadas do fumigante fossem testadas.

CASTRO & PACHECO (1995) estudaram os efeitos da fosfina em arroz com casca com atividades de água de 0,84 e 0,90 (equivalente a teores de umidade de 16,0 a 19,1%, b.u.), exposto a 0,5; 1,0 e $1,5\text{g m}^{-3}$ de fosfina, por 7 e 14 dias, a 28°C . Esses autores observaram decréscimo na percentagem total de grãos infectados internamente por fungos com o aumento da concentração do fumigante. Para ambas as atividades de água estudadas, a concentração de

0,5 g m⁻³ controlou *Eurotium* spp e as de 1,0 e 1,5 g m⁻³ controlaram os fungos de armazenamento durante os dois períodos de exposição estudados. O menor nível de infecção fúngica foi obtido na concentração de 1,5 g m⁻³ nos grãos com atividade de água mais elevada.

6.1.3. No controle de aflatoxinas

HOCKING & BANKS (1991a) verificaram que não houve produção de aflatoxinas em trigo com 0,80 e 0,86 de atividade de água exposto a 0,1g m⁻³, mas a atividade de água estava próxima do limite necessário para o crescimento dos fungos aflatoxigênicos e abaixo do nível no qual a toxina pode ser formada (WHEELER, HOCKING & PITT, 1988; NORTHOLT *et al.*, 1976). CASTRO, PACHECO & TANIWAKI (1992) verificaram que 0,5g m⁻³ de fosfina foi suficiente para controlar a produção das aflatoxinas B₁ e G₁ por até 14 dias de armazenamento, em amendoim armazenado em casca, com atividade de água favorável à produção de aflatoxinas.

6.1.4. Sobre fungos e aflatoxinas em fumigações comerciais

Experimentos em armazéns foram realizados visando verificar o efeito da fosfina sobre fungos em fumigações comerciais. CASTRO *et al* (1995) realizaram estudos em um armazém do Instituto de Tecnologia de Alimentos, em Campinas, São Paulo, Brasil, no qual duas pilhas, cada uma contendo 40 sacos de amendoim em casca com teor de umidade acima do recomendado foram fumigadas por um período de 7 dias. Aplicou-se uma dose inicial de 3g m⁻³ de fosfina, seguida de outra igual após 24h, para se obter uma concentração entre 1,0 e 1,5g m⁻³ ao final do período de exposição. Logo após a fumigação, não foram detectados *A. flavus*/*A. parasiticus* e aflatoxinas na pilha tratada com fosfina, enquanto na pilha não-tratada verificou-se a presença desses fungos no meio e na base da pilha e a de aflatoxinas no seu topo (20µg/kg B₁, 16µg/kg G₁) e na base (24µg/kg B₁, 5µg/kg B₂). Um mês após a fumigação, a percentagem de grãos infectados com *A. flavus*/*A. parasiticus* na base e no meio da pilha não-

tratada foi aproximadamente 8 vezes maior, em relação à base da pilha tratada, e 3 vezes maior, em relação ao meio da pilha tratada. Não foram detectadas aflatoxinas na base e no meio das pilhas fumigadas, enquanto, nas pilhas não-tratadas, foram encontradas aflatoxinas (270-600µg/kg B₁, 18-92µg/kg B₂) nas camadas correspondentes.

Em um segundo experimento (CASTRO *et al.*, 1996), realizado em um armazém comercial localizado na principal região produtora de amendoim do Estado de São Paulo, 3 pilhas (de um total de 6) contendo 36 sacos (25kg cada um) de amendoim em casca, na faixa de umidade de 18 a 21% bu, foram submetidas ao mesmo tratamento com fosfina que aquele mencionado no estudo anterior, sendo que uma terceira dose foi aplicada 144 horas depois. Antes da fumigação, a percentagem de grãos infectados por *A. flavus/A. parasiticus* variava de 0 a 13%, enquanto aflatoxinas (até 191µg/kg) foram detectadas em todas as pilhas. Logo após a fumigação um aumento acentuado de *A. flavus/A. parasiticus* (73 a 100% dos grãos) e de aflatoxinas (até 10.000µg/kg) foi observado nas pilhas não-tratadas, enquanto nas pilhas tratadas, a percentagem de infecção fúngica e contaminação por aflatoxinas manteve-se inalterada em relação aos valores observados inicialmente. Após 30 dias, as pilhas tratadas apresentaram o mesmo grau de infecção/contaminação das pilhas não-tratadas, provavelmente devido à recontaminação do produto com inóculo proveniente de amendoim intensamente mofado, que foi depositado ao lado das pilhas fumigadas.

DHARMAPUTRA *et al.* (1991) verificaram os efeitos da fosfina sobre os fungos e produção de aflatoxinas em milho armazenado, porém a metodologia empregada e as condições do produto utilizado no experimento não foram adequadas para obtenção de dados conclusivos. Esses autores aplicaram o fumigante na concentração de 2g/ton, por 5 dias, em duas pilhas de 4 sacos cada uma, sendo que duas permaneceram sem tratamento como controle. Verificaram que o tratamento reduziu a percentagem de grãos infectados por *Eurotium chevalieri* e *Aspergillus wentii* e que não houve diferença significativa no conteúdo

de aflatoxina B₁, tanto nas pilhas de milho controle como nas pilhas tratadas com fosfina. No entanto, os autores utilizaram milho seco (na faixa de 13 a 14% de umidade) condição essa na qual a maioria dos fungos se encontra em estado dormente; nesta situação sabe-se que a fosfina teria um efeito muito reduzido (SINHA, BEREK & WALLACE, 1967; RAGHUNATAN & MAJUNIDER, 1969). Dentre os fungos que não estariam ativos, destaca-se o *A. flavus* cuja atividade de água mínima para germinação e crescimento está em torno de 0,80 (PITT & MISCAMBLE, 1995) o que corresponderia a teores de umidade no milho ao redor de 18%, ou seja, bem acima dos valores utilizados no experimento. Outro fator a considerar é que o produto já apresentava contaminação com aflatoxinas antes do tratamento e essas, logicamente, se mantiveram após a fumigação, uma vez que a fosfina não destoxifica o produto já contaminado.

7. Ergosterol

O ergosterol é o esterol predominante em fungos, com exceção de alguns ficomicetos aquáticos e alguns fungos causadores de ferrugens em plantas (WEETE, 1974; 1980). Não é encontrado em quantidades significativas na maioria das plantas (MATCHAM, JORDAN & WOOD, 1984). Conseqüentemente, a detecção do ergosterol em alimentos e em amostras coletadas no meio ambiente é uma forte evidência da presença de fungos. Experimentos com ergosterol visando verificar a contaminação fúngica em grãos armazenados foram realizados primeiramente por SEITZ *et al.* (1977; 1979). Desde então, vários trabalhos têm sido publicados sobre o assunto (CAHAGNIER *et al.*, 1983; CAHAGNIER, LESAGE & RICHARD-MOLARD, 1993; MILLER, YOUNG & TRENHOLM, 1983; SCHWARDORF & MULLER, 1989; SCHNÜRER & JONSSON, 1992; BÖRJESSON, STÖLLMAN & SCHNÜRER, 1992; TOTHILL, HARRIS & MAGAN, 1992). As vantagens dessa técnica em relação aos demais métodos utilizados são a elevada sensibilidade de detecção, especificidade e rapidez da análise.

O procedimento básico para a análise de ergosterol envolve a extração da amostra com metanol (SEITZ *et al.*, 1977; 1979) ou etanol (NEWELL, ARSUFFI &

FALLON, 1988; ZILL, ENGELHARD & WALLNOFER, 1988), saponificação, partição, extração dos insaponificáveis, limpeza do extrato e quantificação. Os métodos utilizados para quantificação são cromatografia em camada delgada (CCD) (RAO *et al.*, 1989) espectroscopia de ultravioleta e modernamente cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

SEITZ *et al.* (1977) compararam a extensão da invasão fúngica pré-colheita em amostras de grãos de sorgo, trigo e milho com o plaqueamento direto dos grãos. O nível de ergosterol forneceu uma estimativa quantitativa da invasão prévia por fungos apesar desses não estarem mais viáveis. Grãos de milho com danos fúngicos evidentes tinham tanto quanto 200µg/g de ergosterol, enquanto grãos sadios recém-colhidos apresentaram cerca de 0,2µg/g. Os níveis mais reduzidos foram encontrados nos grãos recém-colhidos, coletados manualmente e que não apresentavam danos fúngicos visíveis. Os níveis mais elevados de ergosterol foram encontrados em várias amostras selecionadas manualmente, com grãos descoloridos e estragados invadidos principalmente por *Fusarium* sp.

CAHAGNIER *et al.* (1983) realizaram experimentos com milho e arroz em casca estocando esses produtos à temperatura constante de 30°C e temperaturas variando de 25°C/40°C e umidades relativas de 93, 85, 80 e 72%. Para cada caso, as espécies dominantes foram identificadas e a contagem de bolores, conteúdo de ergosterol e ácidos graxos estabelecidos. Para as umidades relativas superiores a 80%, boas correlações ($r \cong 0,92-0,99$) foram observadas entre a contagem de bolores, o teor de ergosterol e o teor de ácidos graxos dos grãos, o mesmo não ocorrendo para as umidades relativas mais baixas (0,72Aa a 0,80Aa). Esses mesmos autores comentam que para o milho o nível de ergosterol é considerado sempre inferior ao do trigo (cerca de 0,3µg/g).

SCHNÜRER (1991) determinou a contaminação fúngica de farinha, farelo de trigo fino e grosso estocado com 12, 16, 20 e 25% de umidade, utilizando a contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) e o nível de ergosterol. Os

valores mais elevados foram encontrados no trigo armazenado com elevados níveis de umidade. Uma fraca correlação foi encontrada entre os valores de UFC(s) e o conteúdo de ergosterol (no MEA $r = 0,67$ $P < 0,01$ e no MAS $r = 0,58$ e $P < 0,05$). O nível de ergosterol, segundo CAHAGNIER, LESAGE & RICHARD-MOLARD (1993), mostrou ser um melhor indicador da qualidade tecnológica de cereais (verificada pela acidez) do que a contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, H.K. *et al* Toxigenity of *Fusarium poliferatum* and other *Fusarium* species isolated from corn ears in Minnesota. **Phytopathology**, Saint Paul, v.78, p.1258-60, 1988.

ABREU, A.P.N. *et al*. Contamination potential by aflatoxin in commercialized corn in Bastos- SP Region. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 10., 2000, Guarujá. **Resumos...** Guarujá: [s.n.], 2000. p.123.

AGROFIT. Inseticidas. Disponível em: <<http://www.agricultura.com.br>>. Acesso em 03 set.2002.

AMORIM, S.S. *et al*. Occurrence of mycotoxins in food and feed in Brazil. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 10., 2000, Guarujá. **Resumos...** Guarujá: [s.n.], 2000. p.161.

ATHIÉ, I. *et al*. **Conservação de grãos**. Campinas: Fundação Cargill, 1998. 236p.

BAILLY, J.R.; LEITÃO, J.; CABROL-TELLE, A.M. Effet antifongique du phosphore dhydrogene sui diverses moisissures isolées de produits alimentaires. **Sciences des Aliments**, Paris, Serie V, v.5, p.251-256, 1985.

BAILLY, J.R. *et al.* Modification de la flora fungique de produits alimentaires par l'emploi d'un fumigant: le PH₃. Problème toxicologiques éventuels. **Sciences des Aliments**, Paris, Serie VIII, v.7, p.323-328, 1987.

BALDISSERA, M.A. *et al.* Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em grãos e rações para consumo animal no sul do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 12, p.77-82, 1992.

BARRETO, F.A; BIACHI,O; BIANCHI,B. Refrigeración de granos, abordajes teórico y práctico.In: CONFERÊNCIA NACIONAL DE PÓS-COLHEITA, 2., 2001, Londrina. **Valorização da produção e Conservação de grãos no Mercosul**: resumos e palestras. Londrina: [s.n.], 2001. p.285-286.

BÖRJESSON, T.; STÖLLMAN, V.; SCHNÜRER, J. Volatile metabolites produced by fungal growth on cereal grains. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2599-2605, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº10/85 de 8 de Março de 1985. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 mar. 1985.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Ministério da Saúde. Resolução nº34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Seção I, pt 1, p.710. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos, 19 jan.1977.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Ministério da Agricultura. Portaria nº183, de 21 de mar.1996. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 de mar.1996. Art. 1. Adotar Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho, aprovado pela Resolução do Grupo Mercado Comum do Sul nº 56/94, de 01 jan.1995.

BRASIL. Resolução nº 274, de 15 de outubro de 2002. Aprova o regulamento técnico sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim e no milho. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 16 out. 2002. Disponível em: <http://www.amvisa.gov.br/legis/resol/2002/274-02rdc.htm>. Acesso em: 12 nov. 2002.

BULLERMAN, L.B.; SCHROEDER, L.L.; PARK, K.Y. Formation and Control of Mycotoxins in Food. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.47, n.8, p 637-646, 1984.

BUTTLER, W.H. Aflatoxin. In: PURCHASE, I. F.H.(Ed). **Mycotoxins**. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1974. v.1, p.1-28.

CAHAGNIER, B. *et al.* Evolution de la teneur en ergosterol des grains au cours de la conservation. une possibilité dévaluation quantitative et rapide de leur mycoflore. **Sciences des Aliments**, Paris, v.3, p.219-244, 1983.

CAHAGNIER, B.; LESAGE, L.; RICHARD-MOLARD, D. Mould growth and conidiation in cereal grains as affected by water activity and temperature. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v.17, p.7-13, 1993.

CASTRO, M.F.P.P.M.; PACHECO, I.A. Utilization of the phosphine fumigant for the control of fungi naturally present in stored paddy rice (*Oryza sativa*, L.), **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.26, n.3, p.230-235, 1995.

CASTRO, M.F.P.P.M.; PACHECO, I.A.; TANIWAKI, M.H. Effects of phosphine on aflatoxin production in peanuts stored with a high content. In: METHYL BROMIDE TECHNICAL OPTIONS WORKSHOP, 1992, Washington. Washington USA: [s.n.], 1992.

CASTRO, M.F.P.P.M.; SOARES, L.M.V.; FURLANI, R.P.Z. Mycoflora, aflatoxigenic species and and mycotoxins in freshly harvested corn (*Zea mays*, L.):

a preliminary study. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.26, n.4, p.289-295, 1995.

CASTRO, M.F.P.P.M. *et al.* Phosphine fumigation of stored peanuts for *A.flavus* Link/ *A.parasiticus* Speare and aflatoxins control. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.26, n.4, p.296-301, 1995.

CASTRO, M.F.P.P.M. *et al.* Warehouse control of *A.flavus* Link/ *A. parasiticus* Speare on peanuts (*Arachis hypogaea*, L.) by phosphine fumigation and its effects on aflatoxin production. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, n.4, p.407-411, 1996.

CONAB. Produção brasileira de grãos: tabela. Disponível em: <<http://www.agricultura.com.br>> Acesso em 10 mar. 2002.

CORRÊA, T.B.S. *et al.* Evaluation of the incidence of mycotoxins in brazilian maize. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM IUPAC ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 10, 2000, Guarujá. **Resumos...** Guarujá: [s.n.], 2000. p.134.

DHARMAPUTRA, O.S. *et al.* The effects of phosphine on storage fungi of maize. In: PROCEEDINGS OF THE SYMPOSIUM ON PESTS OF STORED PRODUCTS, 1991, Bogor, Indonesia. **Anais...** Borgor: [s.n.], 1991: p.107-119.

FONSECA, H. **Fórmulas**. Disponível em: < <http://www.micotoxinas.com.br> > Acesso em : 10 mar. 2002.

FONSECA, H. *et al.* Natural occurrence of mycotoxins in some Brazilian foods: Part I. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM MYCOTOXIN AND PHYCOTOXINS, 5., 1982, Viena. **Anais...** Viena, [s.n.], 1982. p.76-79.

FONSECA, H. *et al.* Natural occurrence of mycotoxins in some Brazilian foods: Part II. In: WORLD CONGRESS OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, 6., 1983, Dublin. **Anais...** Dublin: Boole Press, 1983. p.53-54.

GLORIA, E.M.; FONSECA, H.; SOUZA, I.M. Occurrence of mycotoxins in maize delivered to the food industry in Brazil. **Tropical Science**, London, v.37, p.107-110, 1997.

HENNIGEN, M.R.; DICK, T. Incidence and abundance of micotoxins in grain (maize) used for animal nutrition in Rio Grande do Sul. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 7., 1992, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: [s.n.], 1992. 39p.

HESELTINE, H.K. A guide to fumigation with phosphine in the tropics. **Tropical Stored Products Information**, Slough, v.24, p.25-36, 1973.

HOCKING, A D. Effects of fumigation and modified atmosphere storage on growth of fungi and production of mycotoxins in stored grains. In: FUNGI AND MYCOTOXINS IN STORED PRODUCTS; PROCEEDINGS OF AN INTERNATIONAL CONFERENCE HELD AT BANGKOK, 1991, Thailand. **Proceedings...** Thailand: ACIAR, 1991. p.145-156.

HOCKING, A. D., BANKS, H. J. Effects of phosphine fumigation on survival and growth of storage fungi in wheat. **Journal of Stored Product Research**, Oxford, v.41, n.1, p.232, 1991a.

HOCKING, A. D., BANKS, H. J. Effects of phosphine fumigation on the development of storage mycoflora in paddy rice. In: INTERNATIONAL WORKING CONFERENCE ON STORED-PRODUCT PROTECTION, 5., 1991, Bordeaux, França. **Anais...** Bordeaux: [s.n.], 1991b. p.823-831.

KINOSHITA, K. Qualidade do milho para moagem úmida. In: CONFERÊNCIA NACIONAL DE PÓS-COLHEITA, 2., 2001, Londrina. **Valorização da produção e**

conservação de grãos no Mercosul: resumos e palestras. Londrina, [s.n.], 2001. p.135-145.

KLICH, M. A.; PITT, J.I. A Laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. North Ryde: CSIRO, 1988. 116p.

LEITÃO, J.; SAINT-BLANQUET, G.; BAILY, J.R. Action of phosphine on production of aflatoxins by various *Aspergillus* strains isolated from foodstuffs. **Applied Enviromental Microbiology**, Washington, v.53, p.2383, 1987.

MACHINSHI, M. *et al.* Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in corn cultivars planted in the State of São Paulo. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 10, 2000, Guarujá. **Resumos...** Guarujá: [s.n.], 2000. p.142.

MAGOON, K.K., VISWANATHAN, L.; VENKITASUBRAMANIAN, T.A. The chemistry of aflatoxins. **Journal Science Industrial Research**. v.29, p.8, 1970.

MATCHAM, S.E.; JORDAN, B.R.; WOOD, D.A. Methods for assessment of fungal growth on solid substrates. In: GRAINGER, J.M.; LYNCH, J.M.(Eds.). **Microbiological methods for environmental biotechnology**. London: Academic Press, 1984. p.5-18.

MENEGAZZO, R. *et al.* Amostragem e monitoramento de micotoxinas em matérias-primas para rações. In: CONFERÊNCIA NACIONAL DE PÓS-COLHEITA, 2., 2001, Londrina. **Valorização da produção e conservação de grãos no Mercosul:** resumos e palestras. Londrina, [s.n.], 2001. p.161-171.

MILLER, J.D., YOUNG, J.C.; TRENHOLM, H.L. Fusarium toxins in field corn. I. Time course of fungal growth and production of deoxynivalenol and other mycotoxins. **Canadian Journal of Botany**, v.61, p.3080-3087, 1983.

MILLS, J.T. Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* species on cereal seeds. **Journal of Food Protection.**, Des Moines, v 52, p. 737-742, 1989.

NAKAKITA, H.; KATSUMATE, Y.; OZAWA, T. The effect of phosphine on respiration of rat liver mitochondria. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v.69, p.589-593, 1971.

NATARAJAN, T.; BAGYARAJ, D.J. Fumigation effect on microflora and viability of blackgram and fieldbean seeds. **Pesticides**, Bombay, v.18, p.40-2, 1984.

NEWELL, S.Y.; ARSUFFI, T.L.; FALLON, R.D. Fundamental procedures for determining ergosterol content of decaying plant material by liquid chromatography. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.1876-1879, 1988.

NOGUEIRA Jr., S., NOGUEIRA, E.A., TSUNECHIRO, A. **Considerações sobre a agroindústria do milho**. São Paulo: Instituto de Economia Agrícola, 1987. 18p. (Relatório de Pesquisa, 27).

NORTHOLT, M.D. *et al.* Effect of water activity and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Milk and Food Technology**, Orange, v.39, n.3, p.170-174, 1976.

NORTHOLT, M.D.; VAN EGMOND, H.P.; PAULSCH, W.E. Differences between *Aspergillus flavus* strains in growth and aflatoxin production in relation to water activity and temperature. **Journal of Food Protection**. Des Moines, v.40. p.778-781, 1977.

PEDROSA, A.V.B.; DEZEN, R.B. O milho: características do mercado e perspectivas. **Preços Agrícolas**, São Paulo, v.55, p.1-4, 1991.

PEERS, F.G.; GILMAN, G.A.; LINSELL, C.A. Dietary aflatoxins and human liver cancer: A study in Swaziland. **International Journal Cancer**, New York, v.17, p.167, 1976.

PHOSPHINE fumigation of stored product to control stored product insect pests in general. **European Plant Protection Bulletin**, v.23, p.212-214, 1993.

PITT, J.I. Under what conditions are mycotoxins produced 2:*Aspergillus* species. **Mycotoxins Newsletter**, v.6, n.3, p.1-2, 1995.

PITT, J. I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 2nd ed. Gaithersburg: Aspen Pub., Inc., 1999. 593p.

PITT, J. I.; MISCAMBLE, B.F. Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.58, p.86-90, 1995.

PRADO, G. Incidência de aflatoxina B₁ em alimentos. **Revista de Farmácia e Bioquímica da USP**, São Paulo, v.5, p.147-157, 1983.

PREGNOLATO, W.; SABINO, M. Pesquisa e dosagem de aflatoxinas em amendoim e derivados em outros cereais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.29/30, p.65-71, 1969/70.

RAGHUNATAN, A.N.; MAJUNIDER, S.K. Control of internal fungi of sorghum by fumigation. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v.5, p.389-92, 1969.

RAO, B.S. *et al.* Rapid and specific method for screening ergosterol as an index of fungal contamination in cereal grains. **Food Chemistry**, Saint Paul, v.31, p.51-56, 1989.

REHANA, F., BASAPPA, S.C. Detoxification of aflatoxin B₁ in maize by different cooking methods. **Journal of Food Science and Tecnology**, Mysore, v.27, n.5, p.397-399, 1990.

REN, X. D. *et al.* The effect of different gas composition on the growth of mould mycelia and the germination of spores commonly seen in rice. **Grain Storage**, n.4, p.18-22, 33, 1983.

SABINO, M. Variações de níveis de aflatoxina B₁ em alimentos e rações animais no período de 1971 a 1979. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.40, n.2, p.153, 1980.

SABINO, M. *et al.* Natural occurrence of aflatoxins and zearalenona in maize in Brazil Part II. **Food Additive and Contaminants**, London, v.6, p.327-31, 1989.

SANTÚRIO, J.M. *et al.* Aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em grãos e rações destinadas ao consumo animal no Sul do Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 7., São Paulo, 1992. **Resumos...** São Paulo: [s.n.], 1992. 39p.

SCHNÜRER, J. Distribution of fungal biomass among fine bran, coarse bran and flour from wheat stored at four different moisture levels. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.68, n.4, p.434-437, 1991.

SCHNÜRER, J. ; JONSSON, A. Ergosterol levels and mould colony forming units in Swedish grains of food and feed grade. **Acta Agriculturae Scandinavica**, Stockholm, v.13, p.1-6, 1992.

SCHWARDORF, K.; MULLER, H.M. Determination of ergosterol in cereals, mixed fixed components, and mixed feeds by liquid cromatography. **Journal of Association of Official and Analytical Chemistry**, Arlington, v.72, p.457-462, 1989.

SCUSSEL, V.M. **Estudo da incidência de aflatoxinas em amendoim (*Arachis hypogaea* L.), milho (*Zea mays*, L.) e produtos derivados**. 1984. 151f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SCUSSEL, V.M.; RODRIGUES-AMAYA, D.B.; DA SILVA, W.J. Incidência de aflatoxinas em milho (*Zea mays*, L.) e em seus produtos derivados, comercializados na região de Campinas, Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.6, n.1, p.75-85, 1986.

SEITZ, L.M. *et al.* Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.54, p.1207-1217, 1977.

SEITZ, L.M. *et al.* Ergosterol as a measure of fungal growth. **Phytopathology**, Saint Paul, v.69, p.1202-1203, 1979.

SHEPHARD, G.S. *et al.* World survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. **Journal of AOAC International**, Arlington, v.79, n.3, p.671-687, 1996.

SINHA, R. N.; BEREK, D.; WALLACE, H. A. H. Effect of phosphine on mites, insects and microorganisms. **Journal Economic Entomology**, College Park, v.60, p.125-32, 1967.

STOLOFF, L. Aflatoxinas : an overview. In: RODRICKS, J.V.; HESSELTINE, C.W.; MEHLMAN, M.A.(Eds.). **Mycotoxins in human and animal health**. Illinois: Pathotox Oublishers, 1977. p.7-28.

TOTHILL, I.E.; HARRIS, D.; MAGAN, N. The relationship between fungal growth and ergosterol content of wheat grain. **Mycology Research**, v.96, p.965-70, 1992.

TRUCKSESS, M.W. ; STOLOFF, L.; MISLIVEC, P.B. Effect of temperature, water activity and other toxigenic mold species on growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production on corn, pinto beans and soybeans. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.51, p.361-363, 1988.

UBOLDI EIROA, M.N. Micotoxinas e micotoxicoses. **Boletim do ITAL**, Campinas, v.16, n.4, p.355-411, 1979.

UBOLDI EIROA, M.N.; ARCKOLL, D.B. Investigação de aflatoxinas , patulina e esterigmatocistina em amostras de diversos tipos de farinhas. **Boletim do ITAL**, Campinas, n.57, p.113-121, 1978.

VALE, L.V. Variação dos níveis de aflatoxinas B₁ em milho pipoca comercializado em Fortaleza durante 1991. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS, 7., 1992, São Paulo. **Resumos...** São Paulo, [s.n.], 1992. 39p.

VAN DER ZIJDEN *et al.* Isolation in crystalline form of a toxin responsible for turkey X disease. **Nature**, London, v.195, p.1062, 1962.

WEETE, J. D. Distribution of sterols in fungi: fungal spores. **Lipids**, Illinois, v.9, p.578-581, 1974.

WEETE, J.D. **Lipid Biochemistry of Fungi and Other Organisms**. New York: Plenum Press, 1980. 388p.

WHEELER, K.A; HOCKING, A D. ; PITT, J.I. Water relations of some *Aspergillus* species isolated from dried fish. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v.91, p.631-637, 1988.

WIDIASTUTI, R. *et al.* Cyclopiazonic acid in combination with aflatoxins, zearalenone, and ochratoxin A in Indonesian corn. **Mycopathologia**, Den Haag, v.104, p. 153-156, 1988.

WYLLIE, T.D.; MOREHOUSE, L.G. Mycotoxic fungi, mycotoxins and mycotoxicoses: mycotoxic fungi and chemistry of mycotoxins. New York: Marcel Dekker, 1977. v.1, 537p.

ZILL, G.; ENGELHARD, G.; WALLNOFER, P.R. Determination of ergosterol as a measure of fungal growth using Si 60 HPLC. **Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, Berlin, v.187,p.246-249,1988.

CAPÍTULO 2

DETERMINAÇÃO DE ERGOSTEROL EM MILHO EM GRÃOS COM
DIFERENTES NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO FÚNGICA*

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi otimizar uma metodologia para determinação de ergosterol por cromatografia líquida de alta eficiência para milho em grãos e aplicar a metodologia em amostras com diferentes níveis de contaminação. A metodologia foi aplicada em amostras de milho da variedade Taiúba e do híbrido Cargill 606 com diferentes níveis de contaminação por fungos utilizando milho recém-colhido e inoculado com cepa toxigênica de *Aspergillus flavus* e estocado por 3 e 12 dias a 0,87 e 0,95 de atividade de água. Análises micológicas e de aflatoxinas foram também realizadas para se estabelecer uma possível correlação com o teor de ergosterol. A avaliação micológica foi feita utilizando-se o método do plaqueamento direto dos grãos e diluição em série. O método otimizado de ergosterol apresentou as seguintes etapas: extração com metanol, saponificação (70°C/30min), extração dos insaponificáveis com éter de petróleo e quantificação por CLAE. As condições cromatográficas foram: coluna de C₁₈ Lichrospher 100 (125 x 4mm, 5µm), detector por conjunto de diodos fixado a 282nm e fase móvel isocrática de acetonitrila/ isopropanol (70/30).

Os níveis de ergosterol obtidos nas amostras recém-colhidas foram de 2,1µg/g (variedade Taiúba) e 1,6 µg/g (híbrido Cargill 606) e variaram de 2,6 a 73,4µg/g nas amostras que foram armazenadas nas condições mencionadas. De um modo geral, os níveis mais elevados de ergosterol (>8µg/g) foram encontrados nas amostras com elevados níveis de contaminação por fungos e aflatoxinas. O aumento da contagem das UFC/g de milho correlacionou-se com o aumento no

* Artigo publicado no *Brazilian Journal of Food Technology*, 4:49-55, 2001.

teor de ergosterol. O método otimizado para a determinação de ergosterol por CLAE para milho em grãos mostrou-se rápido, eficiente e simples.

Os dados indicaram que pode existir uma correlação entre os níveis de ergosterol e de aflatoxinas, podendo ser esse componente fúngico um indicador potencial da presença dessas micotoxinas.

Palavras-chave: Milho, ergosterol, metodologia, fungos, aflatoxinas

SUMMARY

ERGOSTEROL DETERMINATION IN CORN GRAINS WITH DIFFERENT LEVELS OF FUNGAL CONTAMINATION

The aim of the present work was to optimize a methodology for ergosterol determination by high performance liquid chromatography in corn grains and to apply it to corn grains with different levels of fungal contamination. The methodology was applied to corn samples of the Taiúba variety and to the Cargill 606 hybrid, both with different levels of fungal contamination, by analysing freshly harvested corn samples and those which had been previously inoculated with an aflatoxigenic *Aspergillus flavus* strain and stored for 3 and 12 days at 0.87 a_w and 0.95 a_w at 25°C. Mycological and aflatoxin analyses were carried out in order to establish any possible correlation with the ergosterol content. The mycological evaluation was performed by the direct plating and dilution technique. The optimized ergosterol method included the following steps: methanol extraction, saponification (70°C/30min.), unsaponifiable material extraction with petroleum ether and quantification by HPLC. The chromatographic conditions were: a Lichrospher 100 reversed phase column (125 x 4 mm, 5 μ m), photodiode array detector set at 282nm and a mobile phase of acetonitrile:isopropanol (70:30). The ergosterol levels obtained for the freshly harvested corn samples were 2.1 (Taiúba variety) and 1.6 μ g/g (Cargill 606 hybrid) and ranged from 2.6 to 73.4 μ g/g, in the samples stored under the previously mentioned conditions. In general the highest ergosterol levels (> 8 μ g/g) were obtained in corn samples with the highest fungal and aflatoxin contamination. The total fungal populations (colony forming units, CFU/g grain) increased with the ergosterol contents. The optimized method was shown to be simple, fast and efficient for the determination of ergosterol in corn.

The data indicate that may be a correlation between ergosterol and aflatoxins levels, thus the ergosterol can be a potential indicator of these mycotoxins presence.

Key words: Corn, ergosterol, methodology, fungi, aflatoxins.

1. INTRODUÇÃO

O milho é um cereal de grande importância econômica em nosso país. O nível de contaminação dos grãos por fungos juntamente com outros indicadores fornece importantes informações sobre a qualidade do produto auxiliando na tomada de decisões sobre o destino de lotes de grãos e em avaliações das condições de estocagem. Os métodos atualmente utilizados determinam as espécies de fungos presentes e sua abundância relativa nas amostras, mas somente avaliam os fungos “vivos” e requerem vários dias para análise. O desenvolvimento e aprimoramento de métodos rápidos para utilização em análises de rotina se torna cada vez mais primordial.

A determinação de ergosterol é útil para se avaliar a invasão fúngica de grãos porque esse esterol é um constituinte de quase todos fungos, não está presente nos grãos e pode ser determinado com confiabilidade e rapidez por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (SEITZ *et al.*, 1977).

O procedimento básico para a análise de ergosterol envolve a extração com metanol (SEITZ *et al.*, 1977; 1979) ou etanol (NEWELL *et al.*, 1988; ZILL *et al.*, 1988), saponificação, partição, extração dos insaponificáveis, limpeza do extrato e quantificação. Os métodos utilizados para quantificação são cromatografia em camada delgada (CCD) (RAO *et al.*, 1989), espectrofotometria de ultra-violeta e CLAE. As vantagens da CLAE em relação aos demais métodos utilizados são a elevada sensibilidade de detecção, especificidade e rapidez da análise.

O objetivo desse trabalho foi otimizar uma metodologia para determinação de ergosterol por CLAE e aplicá-la em milho em grãos com diferentes níveis de contaminação. Análises micológicas e de aflatoxinas foram também realizadas para se estabelecer uma possível correlação com o teor de ergosterol.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

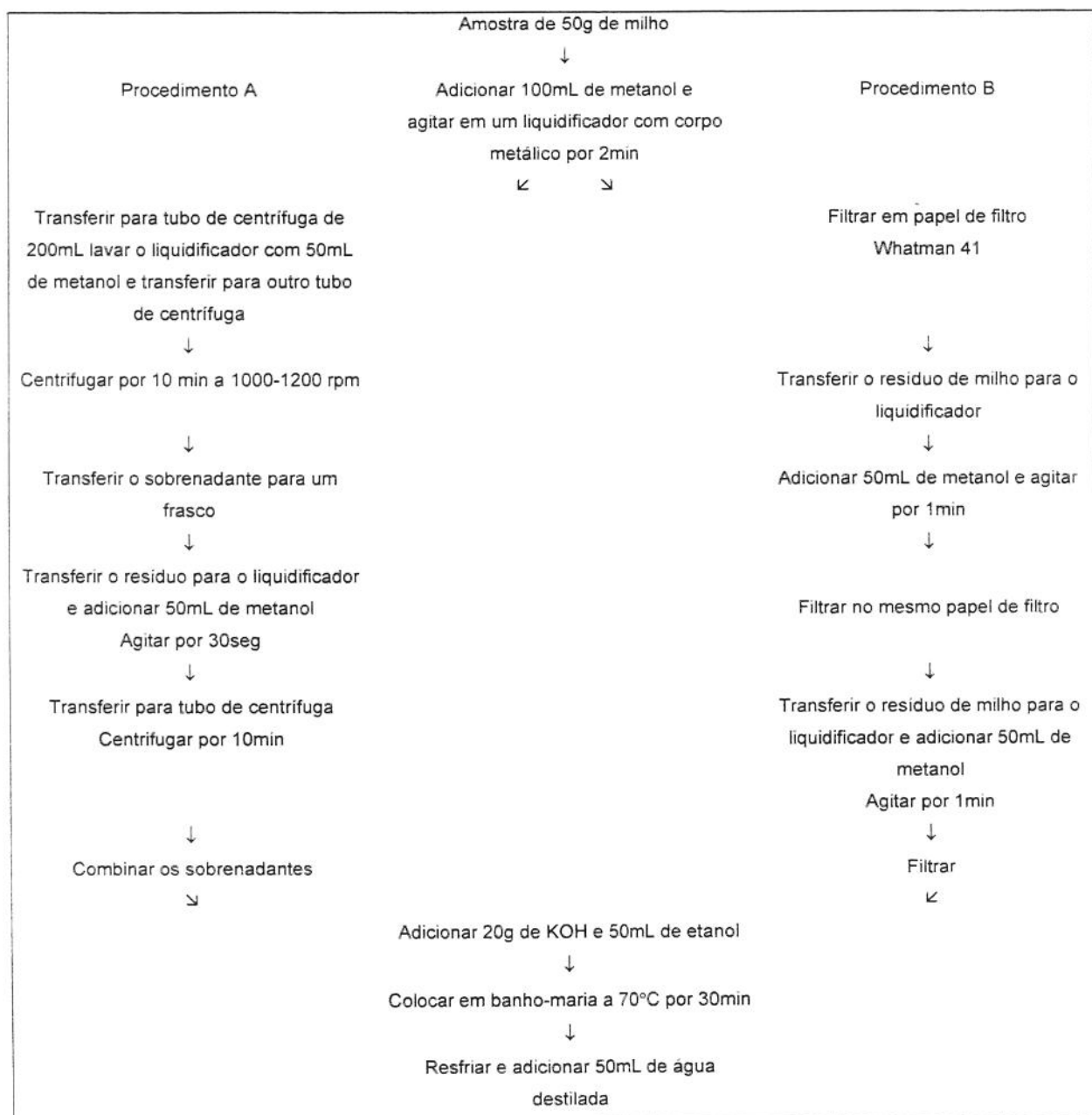
Os experimentos foram conduzidos com milho recém-colhido da variedade Taiúba produzido na Estação Experimental de Capão Bonito do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e híbrido Cargill 606 produzido na Estação Experimental do IAC de Campinas - S.P.- Brasil. Duas amostras (6kg/cada) foram acondicionadas em sacos plásticos, homogeneizadas no homogeneizador Boerner e mantidas no freezer a -20°C até o início do experimento. O conteúdo de umidade inicial do produto foi de 14,4% (base úmida) e 14,8% (base úmida), para a variedade Taiúba e para o híbrido Cargill, respectivamente.

Amostras com diferentes níveis de contaminação por fungos foram obtidas após reumidificação dos grãos (variedade Taiúba) até níveis de atividade de água de 0,87 (equivalente a um teor de umidade nos grãos de 19% em base úmida) e de 0,95 (equivalente a um teor de umidade nos grãos de 21,5% em base úmida). Sub-amostras de 300g em triplicata foram inoculadas com uma suspensão (10^7 esporos/mL) de uma cepa toxigênica de *Aspergillus flavus*, isolada previamente de amostra de milho. A contagem dos esporos foi feita em câmara de Neubauer e confirmada posteriormente pela diluição do inóculo no meio de cultura AFPA (PITT *et al*, 1983). As sub-amostras foram então acondicionadas em recipientes de vidro os quais foram colocados em dessecadores (1 frasco/dessecador) contendo sais de tartarato de sódio e potássio e de nitrato de chumbo de modo a formar ambientes com 87 e 95% de umidade relativa por 3 e 12 dias (WINSTON, BATES, 1960) segundo um planejamento fatorial.

2.2. Métodos

2.2.1. Determinação de ergosterol

A otimização da metodologia para análise do ergosterol foi feita baseando-se naquela descrita por SEITZ *et al.* (1979). Inicialmente foram comparados dois procedimentos de extração, A e B, de acordo com a Figura 1.



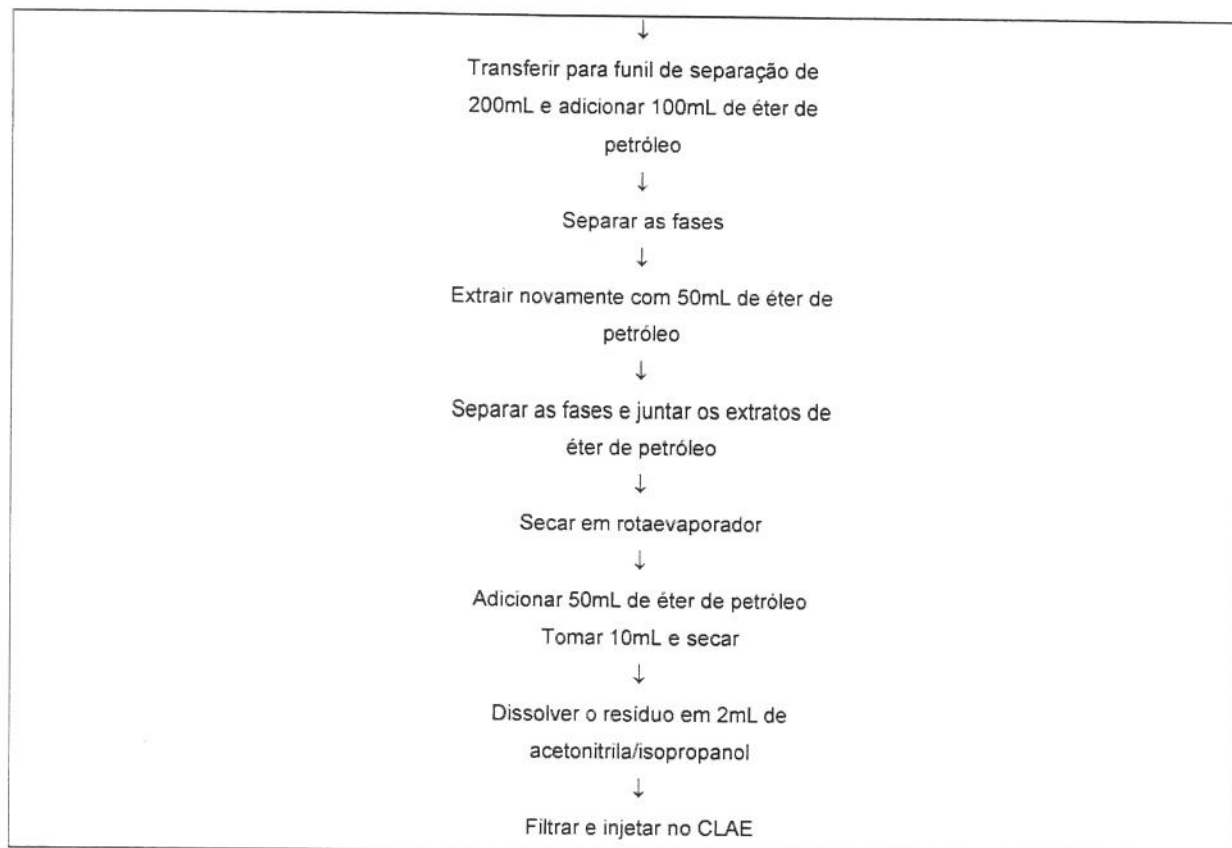


Figura 1. Fluxograma das etapas de extração do ergosterol

Foi avaliada a quantidade de amostra necessária para análise, 25 ou 50g. Testamos também quantas extrações consecutivas da amostra seriam necessárias.

Para a escolha da fase móvel testaram-se várias proporções de acetonitrila/isopropanol (50:50, 60:40, 70:30).

Foi utilizado um cromatógrafo líquido (Shimadzu) com sistema binário de solventes (LC-10AD), válvula "Rheodyne" com alça de amostragem de 20 μ L; coluna de guarda, Lichrospher 100-RP₁₈ (4 x 4 mm, 5 μ m) (Merck, Alemanha); coluna monomérica Lichrospher 100-RP₁₈ (125 x 4mm, 5 μ m) (Merck, Alemanha); fase móvel isocrática acetonitrila/isopropanol (70:30, v/v), vazão de 1,0mL/min; detector de arranjo de diodos (SPD-M10A), coletor de frações (FRC-10A), forno para coluna (CTO-10A) a temperatura de 25°C e software (CLASS-LC10) para integração dos picos. Espectros de absorbância foram tirados entre 190 e 300nm

e os cromatogramas a 282nm. O tempo de corrida foi de 15 minutos. Todos os solventes utilizados foram grau P.A. para a extração e para análise cromatográfica foram grau CLAE, sendo que os últimos foram filtrados e desgaseificados em ultra-som antes do uso.

A identificação do pico de ergosterol foi feita por comparação de tempos de retenção do padrão e da amostra, por co-cromatografia e espectros de absorbância. A pureza do pico nas amostras foi verificada através dos espectros de absorbância obtidos no início, ápice e término do pico

A quantificação foi feita por padronização externa com padrão de ergosterol (Sigma, Estados Unidos, pureza mínima de 90%) e a curva de calibração foi construída com 5 pontos cujas concentrações variaram de 1,0 a 20,3µg/mL. A curva foi linear, passou pela origem e cobriu a faixa de concentração das amostras.

2.2.2 Análises micológicas

O nível de contaminação fúngica foi avaliado utilizando-se o método da diluição em série e do plaqueamento direto. O objetivo de se utilizar esses dois métodos foi o de se tentar obter uma correlação entre os resultados obtidos pelos mesmos e o teor de ergosterol detectado. No plaqueamento direto dos grãos, procurou-se avaliar o percentual de grãos contaminados internamente por diferentes fungos além de *Aspergillus flavus* inoculado experimentalmente. Os grãos foram imersos em uma solução de hipoclorito de sódio 0,4% durante 2 minutos e, em seguida, enxaguados em água destilada estéril. Foram utilizados 50 grãos dispostos em cinco placas de Petri (10 grãos/placa) sobre os meios de cultura DRBC (KING *et al.*, 1979) para detecção total dos fungos e DG18 (HOCKING, PITT, 1980) para detecção das espécies xerofílicas, tais como aquelas pertencentes ao gênero *Eurotium* sp. Os bolores detectados nas amostras incubadas foram submetidos a uma identificação preliminar em nível de gênero, conforme metodologia proposta por SAMSON *et al.* (1981). Os resultados foram expressos em percentual de grãos internamente infectados por fungos ou por determinado gênero/espécie fúngica. No método da diluição em série, para cada

repetição uma sub-amostra de 25g de grãos foi colocada em um liquidificador com copo metálico contendo 225mL de solução peptonada e agitada por 2min., diluindo-se em série 1mL dessa mistura em 9mL desse mesmo diluente. Aliquotas de 0,1mL das várias diluições foram espalhadas sobre placas contendo o meio de cultura DG18. As placas foram incubadas a 25°C por 5 dias quando então foram realizadas as leituras. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias (log).

2.2.3. Análises de aflatoxinas

Amostras de 50g foram extraídas com metanol/KCl% (9+1); o extrato foi clarificado com solução de sulfato de amônia 30% e a partição feita com clorofórmio. A identificação e quantificação foi conduzida por cromatografia de camada delgada por comparação com padrões (SOARES, RODRIGUEZ-AMAYA, 1989). Foram utilizados padrões das aflatoxinas B₁ e B₂ (Sigma, Estados Unidos, pureza de 98%).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinação do ergosterol

O procedimento B, utilizando filtração foi mais rápido, eficiente e fácil de ser executado sendo este o procedimento escolhido para a etapa inicial. Os resultados foram 1,1 e 1,9µg/g de ergosterol para 25 e 50g de amostra, respectivamente. Optou-se por utilizar 50g de amostra pois a distribuição do analito na amostra não é uniforme. Verificamos que 3 extrações são necessárias porque na 3ª extração uma quantidade de ergosterol, embora em níveis reduzidos, foi detectada.

A melhor separação do ergosterol foi obtida com acetonitrila/isopropanol na proporção 70:30. A Figura 2 mostra um cromatograma e espectro de absorbância no U.V. característico do ergosterol

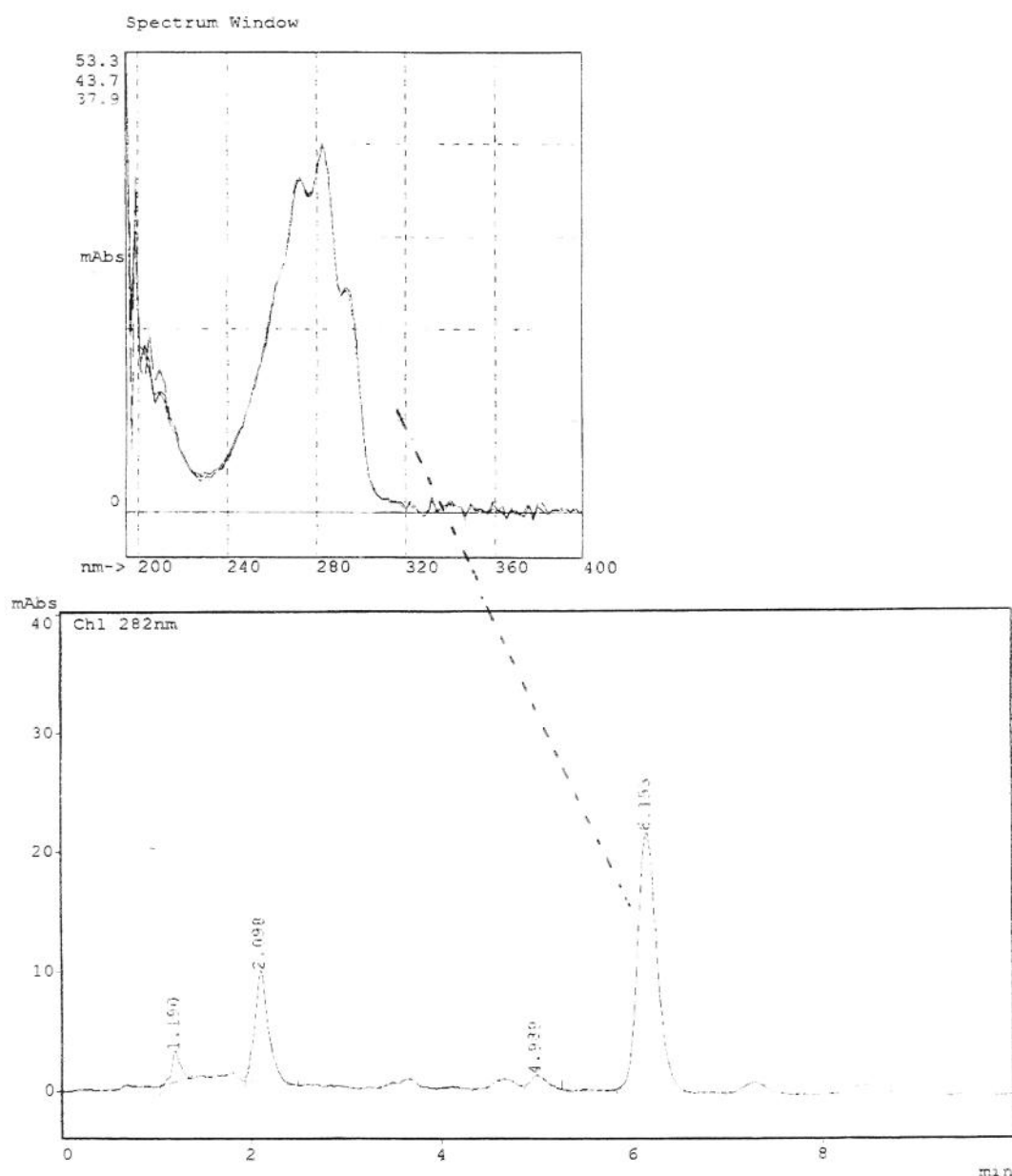


Figura 2. Cromatograma (abaixo) e espectro de absorvância no U.V. (acima) característico do ergosterol em uma amostra de milho da variedade Taiúba, com atividade de água de 0,87, inoculada com *Aspergillus flavus* e estocada por 12 dias à 25°C. Condições cromatográficas; coluna Lichrospher 100-RP 18, 125x4 mm, 5µm; fase móvel: acetonitrila:isopropanol (70:30), vazão: 1,0mL/min e detector por arranjo de diodos fixado a 282 nm.

3.2. Precisão e exatidão do método para determinação de ergosterol

Os valores de recuperação e de repetibilidade do método (CV%) obtidos para ergosterol em dois níveis diferentes encontram-se na Tabela 1.

SEITZ *et al.* (1977) obtiveram recuperação de $93 \pm 5\%$ de ergosterol em amostras de arroz beneficiado, sem contaminação fúngica, utilizando um método por CLAE com condições cromatográficas semelhantes às do presente trabalho. GOURAMA, BULLERMAN (1995) obtiveram recuperações que variaram de 77 a 94% para diferentes níveis de adição de ergosterol (5, 20, 50, 100, 150 e $200 \mu\text{g/g}$ de arroz).

Tabela 1. Taxas de recuperação do ergosterol pelo método otimizado.

Ergosterol adicionado ($\mu\text{g/g}$ de milho)	n	% de Recuperação	
		média $\pm$ DP	%CV
1,2	2	$99,5 \pm 0,5$	0,5
2,4	2	$95,3 \pm 4,7$	5,0

n= número de repetições

DP = desvio padrão

CV= coeficiente de variação

A repetibilidade do método foi também testada em uma amostra sem adição de ergosterol extraída sete (07) vezes e os valores obtidos encontram-se na Tabela 2. O coeficiente de variação (CV%) foi igual a 5,4, o qual é considerado muito bom (HORWITZ, 1982).

Tabela 2. Repetibilidade do método para determinação de ergosterol por CLAE.

N	Tempo de retenção (min)	Ergosterol ($\mu\text{g/g}$)
1	6,32	3,6
2	6,32	3,9
3	6,27	3,7
4	6,28	3,4
5	6,20	3,6
6	6,21	3,5
7	6,15	3,9
Média	6,25	3,6
DP	0,06	0,2
CV(%)	1,00	5,4

DP : Desvio padrão

CV : Coeficiente de variação

O ergosterol é precursor da vitamina D₂ (ergocalciferol) e esta conversão pode ocorrer em produtos agrícolas pela ação da luz solar. Se ergocalciferol estiver presente nas amostras isto pode levar a uma superestimação dos valores de ergosterol, quando uma coluna Hypersil MOS (C₈) for utilizada, uma vez que esta coluna não separa estas substâncias (SCHWADORF, MULLER, 1989). Nas condições analíticas do presente trabalho isto não aconteceu, pois o tempo de retenção do ergocalciferol foi de 3,6 min e o do ergosterol de 6,0 min.

3.3. Teores de ergosterol em milho em grãos com diferentes níveis de contaminação

As amostras de milho recém-colhido da variedade Taiúba e do híbrido Cargill 606 apresentaram teores de ergosterol de 2,1 $\mu\text{g/g}$ e 1,6 $\mu\text{g/g}$, respectivamente (Tabela 3). Essas amostras não apresentavam qualquer

crescimento fúngico visível e os grãos estavam infectados internamente por espécies comumente encontradas nesse produto recém-colhido nas condições climáticas do Estado de São Paulo as quais foram relatadas por CASTRO *et al.* (1995), ou seja, *Fusarium* sp, *Penicillium* sp (*P. funiculosum*, *P. variable*, *P. pinophilum*, etc), *Acremonium* sp, *Nigrospora* sp e outros não esporulantes. Evidenciamos elevada percentagem de grãos infectados por *Fusarium* sp tanto no meio DRBC quanto no DG18, na variedade Taiúba. Essas amostras apresentavam grãos descoloridos e manchados e eram visivelmente de qualidade inferior ao híbrido Cargill 606. SEITZ *et al.* (1977) também encontraram níveis mais elevados de ergosterol em grãos descoloridos e estragados invadidos principalmente por *Fusarium* sp. A ocorrência de cada espécie detectada e o teor de ergosterol estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Percentagem de grãos infectados por fungos e teor de ergosterol nas amostras de milho recém-colhidas da variedade Taiúba e do híbrido Cargill 606.

Espécies fúngicas	Taiúba		Cargill 606	
	DRBC	DG18	DRBC	DG18
<i>Fusarium</i> sp	100%	100%	38%	48%
<i>Penicillium</i> sp	6%	0%	39%	32%
Outros*	-	-	16%	1%
Outros não esporulantes	6%	3%	26%	46%
% de grãos infectados	100%	100%	91%	69%
Teor de ergosterol ($\mu\text{g/g}$)	2,1		1,6	

**Nigrospora* sp, *Acremonium* sp, etc

As amostras de milho da variedade Taiúba foram inoculadas com *A. flavus* e estocadas por 3 e 12 dias com 0,87 e 0,95 de atividade de água. O objetivo da inoculação foi o de assegurar a contaminação dos grãos com uma cepa toxigênica de *Aspergillus flavus* possibilitando avaliar a correlação entre os teores de

ergosterol e de aflatoxinas. Os resultados da análise micológica, teor de ergosterol e de aflatoxinas estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Percentagem de grãos infectados por fungos e contagem de bolores e leveduras (log UFC/g) detectados sobre o DG18, teor de ergosterol e de aflatoxinas nas amostras de milho Taiúba com 0,87 e 0,95 de Aa inoculadas com *A. flavus* e armazenadas por 3 e 12 dias.

Fungos	0,87		0,95	
	3 dias	12 dias	3 dias	12 dias
<i>Fusarium</i> spp	21%	0%	36%	–
<i>Penicillium</i> spp	35%	46%	55%	12%
<i>A. flavus</i>	30%	100%	40%	100%
<i>Geotrichum</i> spp	41%	–	64%	–
<i>Eurotium</i> spp	1%	3%	–	–
Outros não esporulantes	1%	–	–	–
Grãos infectados (%)	94%	100%	100%	100%
Contagem de bolores e leveduras (log UFC/g)	7,3	8,0	8,2	8,3
Teor de ergosterol ($\mu\text{g/g}$)	2,6	8,6	13,0	73,4
Aflatoxinas ($\mu\text{g/kg}$)				
B ₁	traços	427,6	traços	640,7
B ₂	traços	20,5	traços	22,4

A correlação entre os valores de ergosterol e a percentagem de grãos infectados não pode ser feita nas amostras armazenadas, principalmente nas condições mais críticas de atividade de água e tempo de estocagem, uma vez que nessas condições o plaqueamento direto dos grãos atinge o seu limite como medidor da invasão fúngica, não sendo esse o caso do ergosterol. Em nosso estudo condições críticas foram utilizadas, ou seja, inoculação dos grãos e valores de atividade de água elevados, desse modo, a percentagem de grãos infectados

internamente por fungos atingiu o valor máximo (100%) após 12 dias a 0,87 de atividade de água e após 3 dias a 0,95 de atividade de água enquanto que o teor de ergosterol continuou a aumentar indicando que a biomassa fúngica estava aumentando. SEITZ *et al* (1977) também comentaram que os valores de ergosterol correlacionam melhor com o plaqueamento direto dos grãos quando o produto é recém-colhido e os grãos estão levemente infectados.

A contagem fúngica reflete o nível de esporulação e o teor de ergosterol torna possível a obtenção de dados sobre a biomassa fúngica atual. No caso do presente experimento, para ambas as amostras de milho, a contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) aumentou concomitantemente com o aumento no teor de ergosterol (Tabela 4). Diferentemente do método do plaqueamento direto dos grãos, não existem limites máximos para a contagem das unidades formadoras de colônia determinada pelo método da diluição permitindo desse modo verificar possíveis correlações com o teor de ergosterol em grãos altamente infectados, como no caso do presente estudo.

De um modo geral, valores de ergosterol $\geq 8,6$ e infecção por *A. flavus* de cerca de 100% corresponderam a elevados níveis de produção das aflatoxinas B₁ e B₂

Os dados indicam que pode existir uma correlação entre níveis de ergosterol e a presença de aflatoxinas, podendo o ergosterol ser um indicador potencial da presença desses metabólitos. ZILL *et al* (1988) comentaram que a determinação do ergosterol pode ser utilizada para se correlacionar com a atividade fúngica como a síntese de metabólitos secundários tóxicos tais como, aflatoxinas, alternariol e zearalenona. GOURAMA, BULLERMAN (1995) verificaram haver uma correlação positiva entre o ergosterol e a produção de aflatoxina B₁ em arroz armazenado sob condições controladas.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pela concessão de auxílio financeiro à pesquisa e de bolsa de Iniciação Científica

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CASTRO, M.F.P.P.M. DE, SOARES, L. M. V., FURLANI, R.P.Z. Mycoflora, aflatoxigenic species and mycotoxins in freshly harvested corn (*Zea mays*, L.): a preliminary study. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, **26**(4): 289-295, 1995.
- GOURAMA, H.; BULLERMAN, L.B. Relationship between aflatoxin production and mold growth as measured by ergosterol and plate count. **Lebensm.-Wiss. U.-Technol.**, **28**:185-189, 1995.
- HOCKING, A.D.; PITT, J.I. Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low moisture foods. **Appl. Environ. Microbiol.** **39**: 488-492, 1980.
- HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. **Analytical Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 67A-74A, 1982.
- KING, A.D., HOCKING, A.D., PITT, J.I. Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of moulds from foods. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. **37**:959-964, 1979.
- NEWELL, S.Y., ARSUFFI, T.L. & FALLON, R.D. Fundamental procedures for determining ergosterol content of decaying plant material by liquid chromatography. **Appl. Environ. Microbiol.**, **54**:1876-1879, 1988.
- PITT, J. I., HOCKING, A. D., GLENN, D.R. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Applied Bacteriology**, **54**: 109-14, 1983.
- RAO, B.S., RAO, V.S., RAMAKRISHNA, Y. & BHAT, R.V. Rapid and specific method for screening ergosterol as an index of fungal contamination in cereal grains. **Food Chem.**, **31**: 51-56, 1989.

- SAMSON, R.A, HOEKSTRA, E. S., VANOORSCHOT, C.A N. Introduction to food-borne fungi [s.l.]: Centraalbureau voor schimmelcultures, 247p., 1981.
- SCHWADORF, K; MÜLLER, H. Determination of ergosterol in cereals, mixed feed components and mixed feeds by liquid chromatography. **Journal Association Official Analytical Chemistry**, **72**(3), 1989.
- SEITZ , L.M., MOHR, H.E., BURROUGHS, R. & SAUER, B. Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. **Cereal Chem.**, **54**: 1207-1217, 1977.
- SEITZ, L.M., SAUER, D.B., BURROUGHS, R., MOHR, H.E., HUBBARD, J.D. Ergosterol as a measure of fungal growth. **Phytopathology**, **69**:1202-1203, 1979.
- SOARES, L. M. V., RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, **72**: 22-26, 1989.
- WINSTON, P.W. & BATES, D.H. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. **Ecology**, Tempe, USA, **41**(1): 232-5, 1960.
- ZILL, G., ENGELHARD, G. & WALLNOFER, P.R. Determination of ergosterol as a measure of fungal growth using Si 60 HPLC. **Z.Lebensm. Unters. Forsch.**, **187**: 246-249, 1988.

CAPÍTULO 3

EFFECTS OF PHOSPHINE ON THE GROWTH OF *Aspergillus flavus* AND AFLATOXIN PRODUCTION IN CORN GRAINS STORED AT HIGH MOISTURE CONTENTS*

SUMMARY

The objective of this research was to investigate the effects of phosphine on the growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production in corn stored at high moisture contents. In this experiment samples were previously inoculated with an *A. flavus* toxigenic strain. Surface Response Methodology was used to assess the various effects of phosphine on *Aspergillus flavus* in corn grains stored at water activities from 0.85 to 0.98 (equivalent to moisture contents from 15.3% to 24.5%, w.b.), phosphine concentrations from 0 to 4g m⁻³ and exposure times from 1 to 15 days to the fumigant. Analyses of moisture content, water activity, fungi and aflatoxins were carried out in the samples. Phosphine concentration was measured by gas chromatography. A factorial design experiment was carried out to verify the effects of phosphine on aflatoxins production in grains at 0.92 and 0.95 water activities exposed to concentrations of 0.05, 0.1 and 0.2g m⁻³ for 8 and 15 days. In relation to the *Aspergillus flavus* control, the results showed that for the same water activity the factor concentration was more relevant than exposure time to phosphine. As water activity increased, so phosphine concentrations should be increased to achieve the good *A. flavus* control. A phosphine concentration of 0.2g m⁻³ completely arrested aflatoxins B₁ and B₂ production in the grains at 0.92 and 0.95a_w stored for 8 and 15 days. We concluded that phosphine can be an alternative to control *Aspergillus flavus* growth and to avoid aflatoxins production in high moisture corn grains stored for periods of up to 15 days.

* Artigo publicado no *Proceedings of the International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation*, Fresno, USA, v. 1, p.179-191, 2001.

EFEITOS DA FOSFINA NO CRESCIMENTO DE *Aspergillus flavus* E PRODUÇÃO DE AFLATOXINAS EM MILHO ARMAZENADO COM ELEVADOS TEORES DE UMIDADE

RESUMO

O objetivo dessa pesquisa foi investigar os efeitos da fosfina no crescimento de *Aspergillus flavus* e na produção de aflatoxinas em milho armazenado com elevados teores de umidade. Nesse experimento as amostras foram previamente inoculadas com cepa toxigênica de *A. flavus*. A Metodologia da Superfície de Resposta foi utilizada com a finalidade de se verificar os vários efeitos da fosfina sobre *Aspergillus flavus* em milho armazenado com atividade de água de 0,85 a 0,98 (equivalente a conteúdos de umidade de 15,3% a 24,5% b.u.), concentrações de fosfina de 0 a 4g m⁻³ e períodos de exposição de 1 a 15 dias ao fumigante. Análises de teor de umidade, atividade de água, micológicas e de aflatoxinas foram realizadas nas amostras. A concentração de fosfina foi medida por cromatografia gasosa. Um experimento com delineamento fatorial foi realizado para se verificar os efeitos da fosfina sobre a produção de aflatoxinas em milho com atividades de água de 0,92 e 0,95 exposto a concentrações de 0,05; 0,1 e 0,2g m⁻³ por 8 e 15 dias. Em relação ao controle de *Aspergillus flavus* os resultados indicaram que para a mesma atividade de água o fator concentração foi mais relevante que o tempo de exposição a fosfina. Com o aumento da atividade de água as concentrações de fosfina devem ser aumentadas para se alcançar um melhor controle de *A. flavus*. Uma concentração de fosfina de 0,2g m⁻³ evitou completamente a produção das aflatoxinas B₁ e B₂ nos grãos com 0,92 e 0,95Aa armazenados por 8 e 15 dias. Concluimos que a fosfina pode ser uma alternativa para o controle do crescimento de *Aspergillus flavus* e evitar a produção de aflatoxinas em milho em grãos armazenado com elevados teores de umidade por períodos de até 15 dias.

INTRODUCTION

Corn is the main cereal crop grown in Brazil, which is the third major corn producer in the world after China and United States. The tropical weather conditions which prevail during the greater part of the year in Brazil favour fungal growth and mycotoxin production, mainly when the freshly harvested product is kept at a high moisture content, while waiting for drying. The recommended moisture level for safe storage of corn grains is from 12 to 14%. This situation (grains with high moisture contents) can last for several days when the harvest season coincides with the rainy season and thus the product cannot be sun dried. Drying facilities are not available everywhere or if they are, they cannot fully supply the demands. The occurrence of mycotoxins in corn is a problem well known all over the world. Under brazilian climatic conditions the aflatoxins deserve special attention due to their potential carcinogenic effects and because the species *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*, which produce these mycotoxins, are very well adapted and are frequently found in our conditions.

Phosphine, a fumigant used world-wide for insect control, has been shown to be a promising alternative for controlling fungi and mycotoxin production in grain stored with high moisture contents. Its advantages are its low cost, its commercial availability and the fact that it leaves almost no residue in the product. The possible capacity of phosphine to affect mould growth was first tentatively observed in the 1960s; but phosphine was reported to have little effect on dormant fungi (Raghunathan and Majunder, 1969; Sinha, Berck and Wallace, 1967). A decrease in mould development was observed for phosphine-treated wheat (Hocking and Banks, 1991a) and rice grains (Hocking and Banks, 1991b; Castro and Pacheco, 1995). A complete arrest of aflatoxin production in shelled peanuts was observed with a phosphine concentration of 0.5 g m^{-3} for a period of 14 days in a laboratory-scale experiment (Castro, Pacheco and Taniwaki, 1992). The effect of the fumigant was also tested in a warehouse-scale experiment on unshelled peanuts with moisture contents above the recommended level (Castro *et al.*, 1995). Neither *A. flavus* and/or *A. parasiticus* nor aflatoxins were detected in the fumigated stacks immediately after the treatment and a much better control was observed in the

fumigated stacks a month after fumigation. Excellent results were obtained in a second experiment conducted in a commercial warehouse located in a peanut producing area in São Paulo, Brazil (Castro *et al.*, 1996). *A. flavus* and/or *A. parasiticus* were either not detected or were isolated in insignificant amounts and the contamination levels of aflatoxins remained unchanged in stacks of freshly harvested peanuts stored with moisture contents in the range of 18 to 21% treated with phosphine (3.0g m^{-3}) for 7 days. The objective of the current research was to investigate the effects of phosphine on the growth of *A. flavus* and aflatoxin production in corn stored at high moisture contents. In these experiments samples were previously inoculated with an *A. flavus* toxigenic strain. Response Surface Methodology was used in order to assess the various effects of the phosphine on *A. flavus* in corn grains stored at water activities from 0.85 to 0.98 (equivalent to moisture contents from 15.3% to 24.5%, w.b.), phosphine concentrations from 0 to 4g m^{-3} and exposure times from 1 to 15 days to the fumigant. Analyses of moisture content, water activity, fungi and aflatoxins were carried out in the samples. Phosphine concentrations were obtained by gas chromatography. A factorial design experiment was carried out to verify the effects of phosphine on aflatoxins production in grains at 0.92 and 0.95 water activities exposed to concentrations of 0.05, 0.1 and 0.2g m^{-3} for 8 and 15 days.

MATERIALS AND METHODS

Raw material

The experiments were conducted with the corn hybrid Cargill 606, freshly harvested and sun-dried, grown at the Experimental Station of the Instituto Agronômico de Campinas, São Paulo, Brazil. The material (approximately 50 kg) was cleaned, homogenised in a Boerner homogeneizer and kept in the freezer at -20°C until the assays were set up. The corn was rehumidified up to the desired level, for each water activity, before the phosphine tests. Rehumidification was performed by adding amounts of distilled water previously calculated in order to increase the initial water activities of the product up to 0.85, 0.87, 0.92, 0.95 and

0.98a_w (equivalent to moisture contents of 15.3%, 16.2%, 19.2%, 21.6% and 24.5%, w.b.).

Source of phosphine

Tablets of commercial aluminium phosphide GASTOXIN™* were used.*

Selection of the toxigenic strain of *Aspergillus flavus*

Samples of corn from different localities were plated on AFPA agar medium (Pitt, Hocking & Glenn, 1983). Strains of *A. flavus* detected were isolated in assay tubes of Czapek agar medium and incubated at 25°C for 10 days in an incubator. The growing cultures were transferred to plates of coconut agar medium (Lin and Dianese, 1976) and observed under ultra-violet light. Aflatoxin quantification was carried out in the cultures, which showed the greatest fluorescence. The culture medium and the colony were homogenised in a mixer and the aflatoxin extracted with chloroform. The extract was filtered and concentrated in a rotary evaporator up to almost complete dryness. Separation was carried out by thin layer chromatography. A strain isolated from the Taiúba variety was chosen due to its high fluorescence in the coconut agar medium. In YES medium, this strain produced 94ppm and 2.7ppm, respectively, of B₁ and B₂ aflatoxins.

Experimental designs

Two experiments were carried out. The first experiment was to verify the effects of phosphine on *Aspergillus flavus* control and the second one to evaluate the effects of this fumigant on the aflatoxins production.

Experimental design and statistical analyses for fungal analyses: A rotational design of second order with three factors and six repetitions at the central point was used by applying the Surface Response Methodology (Box, Hunter and Hunter, 1978). The factors and the level of each factor used in this study are

* TM.: Trade mark

shown in the design table (Table 1) and include: water activities from 0.85 to 0.98, exposure times from 1 to 15 days and phosphine concentrations from 0.0 to 4.0 g m^{-3} . The range intervals for the various factors were selected based on practical and published data.

Table 1. Experimental design.

Assays	Coded			Real Values		
	Water activity	Time (days)	Phosphine (g m^{-3})	Water activity	Time (days)	Phosphine (g m^{-3})
1	-1	-1	-1	0.87	3.8	0.8
2	-1	-1	1	0.87	3.8	3.2
3	-1	1	-1	0.87	12.2	0.8
4	-1	1	1	0.87	12.2	3.2
5	1	-1	-1	0.95	3.8	0.8
6	1	-1	1	0.95	3.8	3.2
7	1	1	-1	0.95	12.2	0.8
8	1	1	1	0.95	12.2	3.2
9	-1.68	0	0	0.85	8.0	2.0
10	1.68	0	0	0.98	8.0	2.0
11	0	-1.68	0	0.92	1.0	2.0
12	0	1.68	0	0.92	15.0	2.0
13	0	0	-1.68	0.92	8.0	0.0
14	0	0	1.68	0.92	8.0	4.0
15	0	0	0	0.92	8.0	2.0
16	0	0	0	0.92	8.0	2.0
17	0	0	0	0.92	8.0	2.0
18	0	0	0	0.92	8.0	2.0
19	0	0	0	0.92	8.0	2.0
20	0	0	0	0.92	8.0	2.0

For each water activity the flasks containing the inoculated samples were distributed in desiccators of 9 litre capacity (1 flask/desiccator), with approximately

500mL of appropriate saturated salt solution for humidity control. The salts used were potassium dichromate (0.98), lead nitrate (0.95), sodium potassium tartrate (0.92), sodium tartrate (0.87) and potassium chloride (0.85) in different concentrations in order to obtain a saturated solution and create equilibria environments of controlled relative humidity varying from 85 to 98% (Winston and Bates, 1960) and a free space volume of 8.7litres. The desiccators were kept in a chamber with a controlled temperature of $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. According to the experimental design previously established, the samples were submitted to different phosphine treatments. Each assay was run three times. Immediately after the phosphine fumigation period, the samples were subjected to the various analyses.

Experimental design and experimental set up for the aflatoxins analysis: A factorial design experiment was carried out in order to verify the effects of phosphine on grains stored at 0.92 and 0.95 a_w (equivalent to 19.2% and 21.6% moisture contents, w.b.) and exposed to phosphine concentrations of 0.0, 0.05, 0.1 and 0.2g m^{-3} for 8 and 15 days. For each water activity the flasks containing the inoculated samples were distributed in desiccators of 9 liter capacity (1flask/desiccator), with approximately 500mL of saturated salt solution. The salts used were lead nitrate (0.95) and sodium potassium tartrate (0.92) at different concentrations in order to obtain saturated solutions and create equilibria environments of controlled relative humidity of 92% and 95%. The desiccators were kept in a chamber with a controlled temperature of $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ and opened after holding for 8 and 15 days. Three repetitions of each treatment were carried out. Immediately after the phosphine fumigation period, the samples were collected for aflatoxin analyses.

Analyses

Water activity and moisture content: The water activities of the samples were determined in a DECAGON apparatus model 2X-T. The moisture content determination was carried out with 15g of grains, in an aerated oven at 120°C , for 72 hours (AACC, 1976).

Phosphine concentration: Phosphine was obtained from Gastoxin tablets in a generator, according to the FAO method n°16 (Anon, 1975). The gas concentration inside the generator was analysed by gas chromatography using a flame photometric detector. A cylinder of phosphine of 99,99% purity was used as a standard to measure the phosphine concentration obtained from the tablets in the generator. The percentage of phosphine from the tablets was obtained by comparing the areas of the pure phosphine obtained from the cylinder with the areas obtained from the tablets. This concentration of phosphine, was assessed as 86%, and this value was used to calculate the required concentrations for the assays, considering that 1mL of phosphine (99,9%) is equivalent to 1.39mg of this gas.

At the end of the exposure times the gas concentrations inside the desiccators were measured again. A phosphine standard curve was used to assess the phosphine concentrations.

The gas chromatographic conditions were: Gas chromatograph HP 6890 with a flame photometric detector, temperature of 150°C, with a phosphorous filter (525nm), hydrogen flow of 150mL/min and air flow of 110mL/min. Capillary column 1909/j413 HP-5 with phenyl methyl siloxane 5% (30m x 320 µm x 0.25 µm) with a constant flow nitrogen of 2.0mL/min and a split injector (50:1) with make up at 60mL/min, both at 150°C. Sampling volume was 20µl and 100µl. The chromatography was linked to a computer (Chemstation) HP Vectra XA.

Fungal analyses: Direct plating methodology was used, in order to evaluate the percentage of grains internally infected with *Aspergillus flavus*. The grains were immersed in 0.4% sodium hypochloride solution for 1 minute and then rinsed with sterile distilled water. Fifty grains were plated (10 grains/plate) on the AFPA culture medium (Pitt, Hocking and Glenn, 1983) for *Aspergillus flavus* detection.

Aflatoxin analysis: Fifty-gram samples were extracted with methanol/ 4% KCl (9+1); the extract was clarified with 30% ammonium sulfate solution and partitioned with chloroform. Identification and quantification was conducted via thin layer chromatography by comparison with standards (Soares and Rodrigues-Amaya, 1989).

RESULTS AND DISCUSSION

Fungal analyses

The fungal analyses results are shown in Table 2.

Table 2. Fungal analyses results.

Assays	a_w	Time (days)	PH_3 (g m ⁻³)	<i>A. flavus</i> AFPA (%)
T1	0.87	3.8	0.8	13
T2	0.87	3.8	3.2	28
T3	0.87	12.2	0.8	3
T4	0.87	12.2	3.2	4
T5	0.95	3.8	0.8	91
T6	0.95	3.8	3.2	34
T7	0.95	12.2	0.8	47
T8	0.95	12.2	3.2	7
T9	0.85	8.0	2	9
T10	0.98	8.0	2	6
T11	0.92	1.0	2	16
T12	0.92	15.0	2	7
T13	0.92	8.0	0	100
T14	0.92	8.0	4	3
T15	0.92	8.0	2	2
T16	0.92	8.0	2	1
T17	0.92	8.0	2	8
T18	0.92	8.0	2	6
T19	0.92	8.0	2	0
T20	0.92	8.0	2	8

As can be seen in Table 2, the percentage of grains internally infected with *Aspergillus flavus* varied from 0 to 100%.

The effect analyses indicated that the water activity, exposure time and mainly phosphine concentrations affect this response. The increase in exposure time and mainly in phosphine concentration decreased the percentage of grains internally infected by *Aspergillus flavus*, on the other hand, as water activity increased the control of this fungi specie was less efficient.

The variance analyses showed that at a confidence level of 85% the calculated Fvalue (7.23) for the regression was higher than the tabulated Fvalue (2.30) and thus the model (real) was valid.

The model and the determinant coefficient (r^2) for the response studied is shown in Table 3. The determinant coefficient was high, showing that the model adequately described the experimental data obtained in the intervals of water activities, exposure time and phosphine concentrations studied.

Table 3. Models and determinant coefficients for the responses studied.

Response	Model ($p < 0,15$)	(r^2)
<i>Aspergillus flavus</i> (%) (AFPA)	$= 132.74 - 1097.87 a_w + 1178.76 a_w^2 + 13.48 t + 0.21 t^2 + 235.36 PH_3 + 12.58 PH_3^2 - 20.75 a_w t - 328.95 a_w PH_3$	84.0%

a_w = water activity

PH_3 = phosphine concentration ($g \cdot m^{-3}$)

t = exposure period to the fumigant (days)

Figure 1 shows the response surfaces for percentage of corn grains internally infected by *Aspergillus flavus* detected on AFPA agar medium as a function of exposure time and phosphine concentration with water activities fixed at 0.89, 0.92 and 0.95 a_w . As can be observed phosphine concentration is more important than exposure time for *Aspergillus flavus* control. As water activity increased, higher phosphine concentrations were needed to get the minimum percentage of grain internally infected by this species.

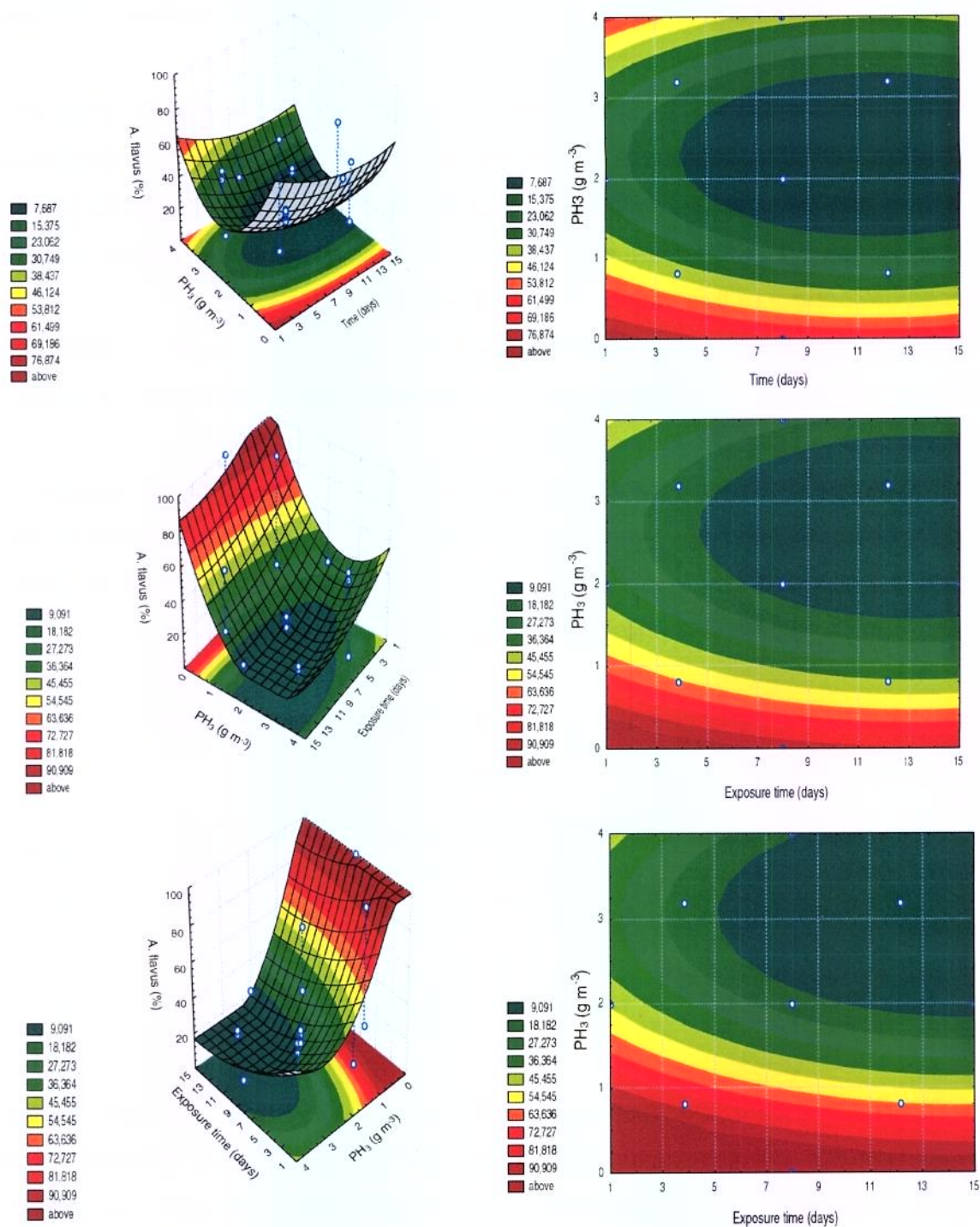


Figure 1. Response surfaces for percentage of grains internally infected by *Aspergillus flavus* detected on AFPA agar medium as a function of exposure time and phosphine concentration with water activity fixed at 0.89 (above), 0.92 (middle) and 0.95 (below) (equivalent to moisture contents of 16.2%, 19.2% and 21.6%, w.b.).

At 0.89a_w the lowest percentage of grains infected with *A. flavus* was achieved with an exposure time of 7 to 15 days and phosphine concentrations of 1.5 to 3.0g m⁻³. When the water activity was fixed at 0.92a_w, the best conditions for *Aspergillus flavus* control were exposure times from 8 to 15 days and phosphine concentrations from 1.8 to 3.5g m⁻³. At 0.95 the lowest percentage of infected grains by *Aspergillus flavus* was achieved with exposure times from 8 to 15 days and phosphine concentrations from 2.0 to 4.0g m⁻³.

Aflatoxin analyses

The results of the factorial design experiment to verify the effects of phosphine in the aflatoxin production are shown in Figures 2, 3, 4 and 5.

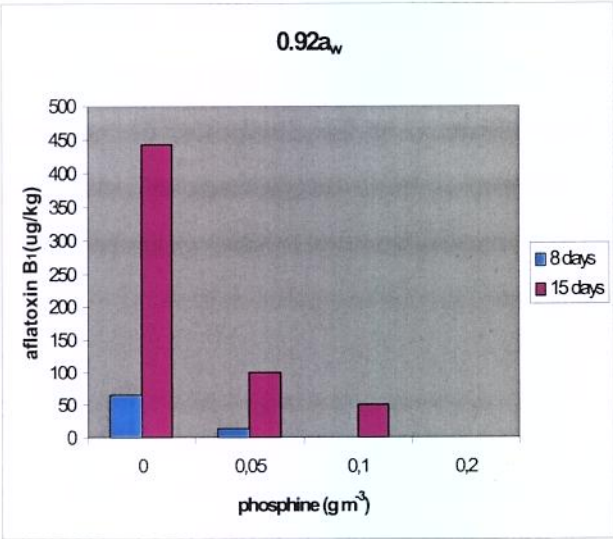


Figure 2. Aflatoxin B₁ (µg/kg) in corn grains stored at 0.92a_w and exposed to 0.05, 0.1 and 0.2g m⁻³ of phosphine for 8 (■) and 15 days (■).

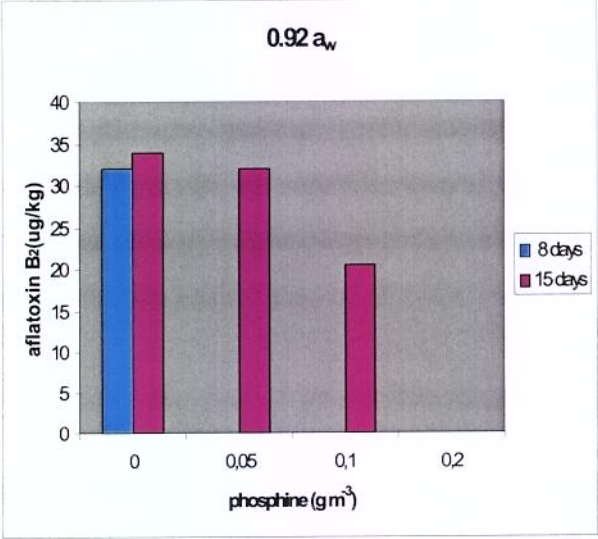


Figure 3. Aflatoxin B₂ (µg/kg) in corn grains stored at 0.92a_w and exposed to 0.05, 0.1 and 0.2g m⁻³ of phosphine for 8(■) and 15 days (■).

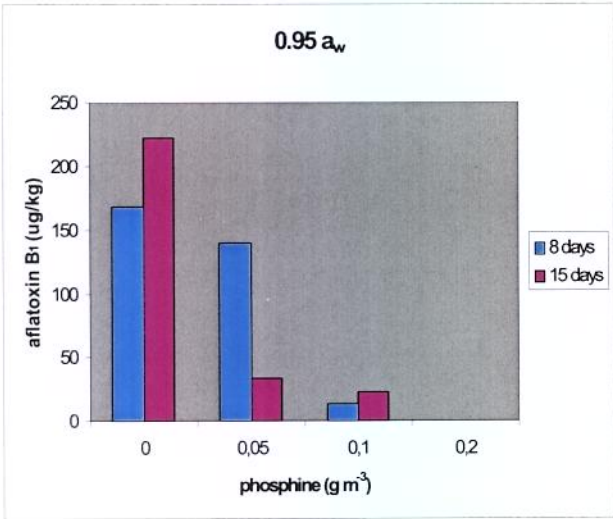


Figure 4. Aflatoxin B₁ (µg/kg) in corn grains stored at 0.95a_w and exposed to 0.05, 0.1 and 0.2g m⁻³ of phosphine for 8 (■) and 15 days (■).

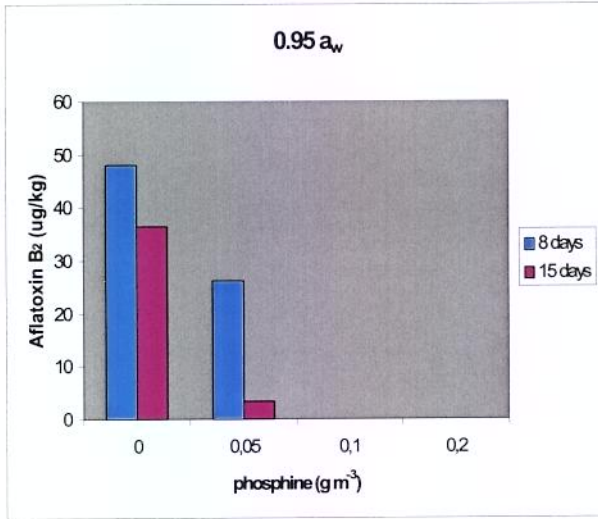


Figure 5. Aflatoxin B₂ (µg/kg) in corn grains stored at 0.95a_w and exposed to 0.05, 0.1 and 0.2 g m⁻³ of phosphine for 8 (■) and 15 days (■).

As can be seen from Figures 2 and 3, at 0.92 a_w , although 0.1g m⁻³ of phosphine completely arrested production of both aflatoxins for 8 days, a concentration of 0.2g m⁻³ was necessary to control these mycotoxins for a storage period of 15 days. When freshly harvested paddy rice (0.92 a_w) was inoculated with *A. parasiticus* and exposed at 28°C to 0.1g m⁻³ phosphine, Hocking and Banks (1991b) also observed that aflatoxins were still formed although the levels in the phosphine treated rice were less than half those in the air controls. As can be seen from figures 4 and 5, at 0.95 a_w a concentration of 0.2g m⁻³ completely arrested the production of both aflatoxins for 8 and 15 days storage. Castro, Pacheco and Taniwaki (1992) verified that a phosphine concentration of 0.5g m⁻³ completely arrested the aflatoxins production in high moisture shelled peanuts for a period of 14 days in a laboratory-scale experiment.

There are two Brazilian laws for aflatoxin limits in food and feeds:

- 30µg/Kg aflatoxins B₁+G₁ -CNNPA 34/76 of the Ministry of Health (Brasil, 1977)
- 20µg/Kg aflatoxins B₁+B₂+G₁+G₂-Regulation 183/96 of the Ministry of Agriculture (Brasil, 1995).

DISCUSSION

Practical considerations

The fumigation of sacked maize at the necessary concentrations should not be difficult when it is done by fumigating stacks of sacks under a gas-proof sheet. For economy of fumigant and to guarantee the concentration and the exposure time it would be necessary to build the stack on a base sheet. This can be rolled together with the covering sheet, or better, the two sheets can be joined with an adhesive. The quality of the seal can be checked by using a vacuum half-life test. The fumigation of maize in bulk in a well-sealed silo with air circulation can be used, provided that the initial dosage will ensure the necessary concentration and

exposure time. An alternative strategy for bulk grain is to put the newly harvested grain directly into large strong polyethylene bags supported by re-usable nylon slings (web) (Mills, pers. comm.). On harvesting or later on arrival at the grain store, the bags can be dosed and sealed. They can then be unloaded and built into stacks, even in the open air, for the necessary exposure time. This treatment is only a holding treatment to preserve the quality of grain, which is in excess of the recommended moisture contents. These methods should give a good distribution of phosphine with minimal leakage. However, there is no requirement for a totally effective treatment since grain which is slightly underdosed will be mixed with well-treated grain before drying and the average amount of mycotoxin should be within the permitted limits. There is still the need for final drying. The grain can be held in this way until dryer capacity is available.

CONCLUSIONS

Based on the prevailing experimental conditions, it can be concluded that:

- When the water activity is constant, the phosphine concentration has a greater effect than exposure time on *Aspergillus flavus* growth.
- Aflatoxin production is more affected by phosphine than is the *Aspergillus flavus* growth and much lower concentrations of the fumigant are needed for aflatoxins control.
- The effects of phosphine on fungal development vary with the type of grain and fungal species to be controlled.
- In practical terms phosphine treatment can be an alternative to keep the grain quality for a short-term storage of high moisture corn grains.

REFERENCES

- Anon. (1975) Recommended methods for the detection and measurement of agricultural pests to pesticides. Tentative method for adults of some major beetle pests of stored cereals with methyl bromide and phosphine. FAO method n°16. *FAO Plant Protection Bulletin*, **23**,12-24, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- American Association of Cereal Chemists (1976) Approved Method of the American Association of Cereal Chemists. St. Paul, Min., USA.
- Box, G.E.P., Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for experimenters. An introduction to design data analysis and model building. New York, John Wiley.
- Brasil (1977) Leis, decretos, etc. Ministério da Saúde. Resolução n°34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília. Seção I, pt 1, p.710. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos, 19 de janeiro de 1977.
- Brasil (1995). Leis, decretos, etc. Ministério da Agricultura. Portaria n°183, de 21 de março de 1996. **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 de março de 1996. Art. 1. Adotar Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho, aprovado pela Resolução do Grupo Mercado Comum do Sul n° 56/94, de 01 de janeiro de 1995.
- Castro, M.F.P.P.M. de, Pacheco, I.A., Taniwaki, M.H. (1992) Effects of phosphine on aflatoxin production in peanuts stored with a high content. In: *Methyl Bromide Technical Options Workshop*. Washington, USA.

- Castro, M.F.P.P.M. de; Pacheco, I.A. (1995). Utilization of the phosphine fumigant for the control of fungi naturally present in stored paddy rice (*Oryza sativa*, L.), *Revista de Microbiologia*, São Paulo, **26**, 230-235.
- Castro, M.F.P.P.M. de; Pacheco, I. A., Soares, L.M.V. and Furlani, R.P.(1995). Phosphine fumigation of stored peanuts for *A. flavus* Link/ *A. parasiticus* Speare and aflatoxins control. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, **26**, 296-301.
- Castro, M.F.P.P.M. de; Pacheco, I.A., Soares, L.M.V., Furlani, R.P.Z., Paula, D.C. de, Bolonhezi, S. (1996). Warehouse control of *A.flavus* Link/ *A. parasiticus* Speare on peanuts (*Arachis hypogaea*, L.) by phosphine fumigation and its effects on aflatoxin production. *Journal of Food Protection*, **59**, 407-411.
- Hocking, A.D. and Banks, H.J. (1991a). Effects of phosphine fumigation on survival and growth of storage fungi in wheat. *Journal of Stored Product Research*, **27**,115-120.
- Hocking, A.D. and Banks, H.J. (1991b). Effects of phosphine fumigation on the development of storage mycoflora in paddy rice. In: *Proc. 5th Int. Working Conf. on Stored-product Protection*, (Edited by Fleurat-Lessard, F. and Ducom, P.), Bordeaux, France, 1990, Imprimerie Médocaine, Blanquefort Cedex, France, 823-831.
- Lin, M. T. and Dianese, J.C. (1976). A coconut agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* sp, *Phytopathology*, **66**, n°12.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. and Glenn, D.R. (1983). An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Applied Bacteriology*, **54**, 109-114.

- Raghunatan, A. N. and Majunder, S.K. (1969). Control of internal fungi of sorghum by fumigation. *Journal of Stored Products Research*, **5**, 389-392.
- Sinha, R.N., Berek, D. and Wallace, H.A.H. (1967). Effect of phosphine on mites, insects and microorganisms. *Journal of. Economy. Entomology*, **60**, 125-132.
- Soares, L.M.V. and Rodrigues-Amaya, D.B. (1989). Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic. *Journal Association Official. Analitical Chemistry*, **72**, 22-26.
- Winston, P.W. and Bates, D.H. (1960). Saturated solutions for the control of humidity in biological research, *Ecology*, Tempe, USA, **41**, 232-235.

ACKNOWLEDEGMENTS

To FAPESP (Foundation for research support from the State of São Paulo) for the financial supports to this research.

CAPÍTULO 4

FUNGI CONTROL BY PHOSPHINE FUMIGATION IN HIGH MOISTURE CORN*

SUMMARY

Control of fungal growth by phosphine was studied in corn stored with high moisture contents. In addition to the natural mycoflora of the grains, the product was inoculated with an *Aspergillus flavus* toxigenic strain. Surface Response Methodology was used in order to assess the various effects of phosphine on fungal growth in the grains, at water activities from 0.85 to 0.98 (equivalent to 15.3% and 24.5% moisture contents, w.b.), phosphine concentrations from 0 to 4 g m^{-3} and exposure times from 1 to 15 days to the fumigant. The control of fungal growth was evaluated by direct plating of the grains, the serial dilution technique and the ergosterol content. Analyses of moisture content, water activity and aflatoxins were also carried out on the samples subjected to the different treatments. Phosphine concentrations were measured by gas chromatography. The results showed that, in general, the phosphine concentration was more important than the exposure time to the fumigant for fungal control. At water activities higher than 0.92, grains should not be kept for periods longer than about 7 days due to the growth of *Fusarium verticillioides* (a potential fumonisin producer) and yeast and yeast-like molds which seemed to be more tolerant to this fumigant. Aflatoxins were not detected in the fumigated samples. It was concluded that phosphine can control fungal growth and the production of aflatoxins and could thus be applied to grains while waiting to be properly dried or when the product is rewetted during storage or ship transportation.

* Trabalho apresentado na *International Conference on Stored Product Protection*, realizada em York, U.K., 2002.

CONTROLE FÚNGICO ATRAVÉS DE FUMIGAÇÃO COM FOSFINA EM MILHO COM ELEVADO TEOR DE UMIDADE

RESUMO

Controle do crescimento fúngico com fosfina foi estudado em milho estocado com elevado teor de umidade. Além da microflora natural dos grãos, o produto foi inoculado com uma cepa toxigênica de *Aspergillus flavus*. A Metodologia da Superfície de Resposta foi utilizada com a finalidade de se verificar os vários efeitos da fosfina no crescimento fúngico nos grãos, com atividade de água de 0,85 a 0,98 (equivalente a 15,3% e 24,5% de teor de umidade, b.u.), concentrações de fosfina de 0 a 4 g m⁻³ e períodos de exposição de 1 a 15 dias ao fumigante. O controle fúngico foi avaliado pelo plaqueamento direto dos grãos, pela técnica da diluição em série e pelo conteúdo de ergosterol. Análises de teor de umidade, atividade de água e aflatoxinas foram também realizadas nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos. As concentrações de fosfina foram medidas por cromatografia gasosa. Os resultados mostraram que, de um modo geral, a concentração de fosfina foi mais importante que o período de exposição ao fumigante para o controle fúngico. Em atividades de água superiores a 0,92, os grãos não devem ser mantidos por períodos superiores a 7 dias devido ao crescimento de *Fusarium verticillioides* (um produtor potencial de fumonisinas), leveduras e “yeast-like molds” os quais parecem ser mais tolerantes a esse fumigante. Aflatoxinas não foram detectadas nas amostras fumigadas. Concluiu-se que a fosfina pode controlar o crescimento fúngico e a produção de aflatoxinas e desse modo poderia ser aplicada aos grãos enquanto aguarda condições para uma secagem adequada ou quando o produto é reumedecido durante o armazenamento ou transporte.

INTRODUCTION

Corn is the main cereal grown in Brazil, which, in turn is the third corn producer in the world after the United States and China. The tropical weather conditions which prevail during most of the year in Brazil favour fungal growth and mycotoxin production, mainly when the freshly harvested product is kept at a high moisture content while awaiting drying. The recommended safe moisture level for the storage of corn grains varies from 12 to 14%. This situation (grains with high moisture content) can sometimes last for a period of days when the harvesting season coincides with the rainy season and the product cannot be sun dried. The drying facilities are not available everywhere, or, if they are, they cannot fully supply the demand during the harvest. Mould growth can also occur when grains are rewetted during storage or in export shipments.

Phosphine, a fumigant used worldwide for insect control, has been shown to be a viable alternative for controlling fungi and mycotoxin production in grain stored at high moisture contents (Castro, Pacheco and Taniwaki, 1992; Castro and Pacheco, 1995; Castro *et al.*, 1995; Castro *et al.*, 1996, Hocking and Banks, 1991a; Hocking and Banks, 1991b). The advantages are its low cost, its commercial availability and the fact that it leaves almost no residue in the product. The fact that phosphine might possibly affect mould growth was first tentatively observed in the 1960s; but phosphine was reported to have little effect on dormant fungi (Raghunatan and Majunder, 1969; Sinha, Berck and Wallace, 1967). A decrease in mould development has been observed in phosphine-treated wheat (Hocking and Banks, 1991a) and rice grains (Castro and Pacheco, 1995; Hocking and Banks, 1991b). A complete arrest of aflatoxin production in shelled peanuts was observed with a phosphine concentration of 0.5g m^{-3} for a period of 14 days in a laboratory-scale experiment (Castro, Pacheco and Taniwaki, 1992). The effect of the fumigant was also tested in a warehouse-scale experiment on unshelled peanuts with moisture contents above the recommended level (Castro *et al.*, 1995). Neither *A. flavus* and/or *A. parasiticus* nor aflatoxins were detected in the fumigated stacks immediately after the treatment and a much better level of control was observed in

the fumigated stacks a month after fumigation compared to the situation in untreated stacks. Excellent results were also obtained in a second experiment conducted in a commercial warehouse located in a peanut producing area in São Paulo, Brazil (Castro *et al.*, 1996). *A. flavus* and/or *A. parasiticus* were either not detected or were isolated in insignificant amounts, and the contamination levels of aflatoxins remained unchanged in stacks of freshly harvested peanuts stored with moisture contents in the range of 18 to 21%, and treated with phosphine for 7 days with three applications of 3.0g of aluminium phosphide/m³, as compared to untreated stacks. The objective of the current research was to investigate the effects of phosphine on the growth of fungi in corn stored at water activities from 0.85 to 0.98 (equivalent to 15.3% to 24.5%, w.b.), exposed to phosphine concentrations from 0 to 4 g m⁻³ for 1 to 15 days.

MATERIALS AND METHODS

Raw material

The experiments were conducted with the corn hybrid Cargill 606, freshly-harvested and sun-dried, grown at the Experimental Station of Instituto Agronomico de Campinas, São Paulo, Brazil. The material (approximately 50 kg) was cleaned, homogenized in a Boerner homogenizer and kept in a freezer at -20°C until the assays were set up. The corn was re-humidified up to the desired level, for each water activity, before the phosphine tests. The re-humidification was performed by adding amounts of distilled water previously calculated in order to increase the initial water activities of the product up to 0.85, 0.87, 0.92, 0.95 and 0.98 water activities (equivalent to moisture contents of 15.3%, 16.2%, 19.2%, 21.6% and 24.5% w.b.). Before setting up the assays, the samples were inoculated (1mL/300g) with a spore suspension (10⁷cfu/g) of an *Aspergillus flavus* toxigenic strain previously selected and tested for aflatoxin production. The *Aspergillus flavus* toxigenic strain was isolated from corn grains. The counting of the spore suspension was carried out in a Neubauer chamber.

Phosphine

Tablets of the commercial aluminium phosphide formulation GASTOXIN each weighing 3g and producing 1g of phosphine, were used.

Experimental design and statistical analyses

A second order rotational design with three factors and six repetitions at the central point was used, by applying the Surface Response Methodology (Box, Hunter and Hunter, 1978). The factors and the level of each factor used in this study are shown in the design table (Table 1) and include: water activities from 0.85 to 0.98, exposure times from 1 to 15 days and fumigant concentrations from 0 to 4g m⁻³. The range interval was selected for the various factors based on practical and published data.

Table 1. Surface Response Methodology design

Assays	Coded			Real Values		
	Water activity	Time (days)	Phosphine dose (g m^{-3})	Water activity	Time (days)	Phosphine dose (g m^{-3})
1	-1	-1	-1	0.87	3.8	0.8
2	1	-1	-1	0.95	3.8	0.8
3	-1	-1	1	0.87	3.8	3.2
4	1	-1	1	0.95	3.8	3.2
5	-1	1	-1	0.87	12.2	0.8
6	1	1	-1	0.95	12.2	0.8
7	-1	1	1	0.87	12.2	3.2
8	1	1	1	0.95	12.2	3.2
9	-1.68	0	0	0.85	8.0	2.0
10	+1.68	0	0	0.98	8.0	2.0
11	0	0	-1.68	0.92	8.0	0.0
12	0	0	+1.68	0.92	8.0	4.0
13	0	-1.68	0	0.92	1.0	2.0
14	0	+1.68	0	0.92	15.0	2.0
15	0	0	0	0.92	8.0	2.0
16	0	0	0	0.92	8.0	2.0
17	0	0	0	0.92	8.0	2.0
18	0	0	0	0.92	8.0	2.0
19	0	0	0	0.92	8.0	2.0
20	0	0	0	0.92	8.0	2.0

For each level of water activity the flasks containing the inoculated samples were distributed in desiccators of 9 litre capacity (1 flask/desiccator), with approximately 300mL of appropriate saturated salt solution. The salts used were saturated solutions of potassium dichromate ($0.98a_w$), lead nitrate ($0.95a_w$), sodium potassium tartrate ($0.92a_w$), sodium tartrate ($0.87a_w$) and potassium chloride ($0.85a_w$) in order to create environments with equilibrium relative humidities (ERH) varying from 98 to 85% and a free space volume of 8.7 litres. The desiccators were

kept in a chamber with a controlled temperature of $25 \pm 2^\circ\text{C}$. According to the previously established experimental design, the samples were submitted to the different phosphine treatments. The phosphine was prepared in a gas burette generator, according to FAO method n° 16 (FAO, 1975). The gas concentration inside the generator was analysed by gas chromatography using a flame photometric detector. A cylinder of phosphine of 99.99% purity was used as a reference to measure the phosphine concentration in the generator. The percentage of phosphine from the tablets was obtained by comparing the areas of pure phosphine from a cylinder with the areas from phosphine obtained from a generator. This concentration was assessed as 86%, and this value was used to calculate the required concentrations for the assays, given that 1mL of phosphine (99.9%) is equivalent to 1.39mg of this gas .

A standard curve of concentration against peak area was obtained in the range of 0.2g m^{-3} to 4.0g m^{-3} and used to assess the experimental phosphine concentrations. A gas-tight syringe was used to take the phosphine from the generator through a septum and introduced it into the desiccators. The assays were carried out in triplicate and the average reported. Immediately after the phosphine fumigation period, the samples were subjected to the various analyses.

Analyses

Water activity and moisture content: The water activity of the samples was calculated using a Decagon instrument model 2X-T. The moisture content determination was carried out with 15g of grains in an aerated oven at 120°C for 72 hours (AACC, 1976).

Phosphine concentration: Phosphine concentration was measured by gas chromatography. The gas chromatographic conditions were: gas chromatograph HP 6890 with a flame photometric detector, temperature of 150°C , with a phosphorous filter (525 nm), hydrogen flow of 150mL/min and air flow of 110mL/min. Capillary column 1909/j413 HP-5 with phenyl methyl siloxane 5% (30m x $320\mu\text{m}$ x $0.25\mu\text{m}$) with a constant nitrogen flow of 2.0mL/min and a split injector (50:1) with make up at 60mL/min, both at 150°C . The chromatograph was linked to

a computer (Chemstation) HP Vectra XA. A 20 μ l sample volume was injected to calculate concentrations from integrated peak areas.

Evaluation of fungal control: The effect of phosphine on fungal growth was evaluated by direct plating of the grains, the serial dilution technique and ergosterol concentrations.

The direct plating methodology was used in order to evaluate the percentage of grains internally infected with different fungi in addition to the *Aspergillus flavus* experimentally inoculated. The grains were immersed in 0.4% sodium hypochloride solution for 1 minute and then rinsed with sterile distilled water. Fifty grains were plated (10 grains/plate) on the DG18 medium (Hocking and Pitt, 1980). The fungi identification was carried out according to the methodology described by Samson *et al.* (1996).

The serial dilution technique was applied in order to evaluate the effects of phosphine on the viable spores and mould fragments. Twenty-five grammes of homogenized grain were suspended in 225mL of peptone water, serial diluting 1mL in 9mL of this same diluent and spreading 0.1mL aliquots on the DG18 agar medium. Plates were incubated for 5 days at 25°C when colony- forming units were counted.

The total fungal biomass of the various samples was evaluated by determining the ergosterol levels according to the methodology described by Castro *et al.* (2001).

Aflatoxins analyses: Fifty-gram samples were extracted with methanol/ 4% KCl (9+1); the extract was clarified with 30% ammonium sulfate solution and partitioned with chloroform. Identification and quantification was conducted via thin layer chromatography by comparison with standards (Soares and Rodrigues-Amaya, 1989).

RESULTS AND DISCUSSION

Fungal and ergosterol analyses

The results of the direct plating, serial dilution technique and ergosterol analyses are shown in Table 2.

The fungal species detected in the samples submitted to the treatments in addition to the *Aspergillus flavus* experimentally inoculated were *Fusarium verticillioides*, *Penicillium* spp (*P. variable*, *P. citrinum*, *P. funiculosum* and *P. pinophilum*), others filamentous fungi, yeasts and yeast-like molds (*Geotrichum* sp. and others not identified). These fungi commonly colonise freshly harvested grains in brazilian climatic conditions (Castro *et al.*, 1995). *Fusarium verticillioides* is a potential fumonisin producer. The *Penicillium* spp. detected are those generally known as “field *Penicillium*” (Mislivec and Tuite, 1970). Yeasts and yeast-like molds are generally present in grains at high moisture contents and cause rancidity and off odours. No *Eurotium* species were detected in the samples submitted to the phosphine treatments probably because, in the conditions of the current research, other fungi were much more competitive or the lowest concentration applied was enough for the control of these specie. In this experiment the lowest phosphine concentration tested was 0.8g m^{-3} . Castro and Pacheco (1995) verified that 0.5g m^{-3} was enough for the control of *Eurotium* spp. when paddy rice at 0.84 and 0.90 a_w was exposed to phosphine for 7 and 14 days.

The external appearance of the fumigated samples was, in general, excellent (Figure 1B) with very few exceptions where there was an extensive growth of yeasts and yeast-like molds on the surface of the grains giving a “white powder” appearance to the surface of the product (Figure 1A). Yeasts and yeast-like molds are very competitive and predominate at high moisture contents and probably these microorganisms were tolerant to this fumigant treatment.

Table 2. Colony forming units (log), infected grains (%) and ergosterol contents (µg/g) in corn samples with different water activities submitted to different fumigation treatments.

Assays	a _w	Exposure time (days)	Phosphine (g m ⁻³)	Fungi (log CFU)	Infected grains (%)	<i>A. flavus</i> (%)	<i>F. verticillioides</i> (%)	<i>Penicillium</i> sp (%)	Yeast and yeast- like fungi (%)	Others (%)	Ergosterol (µg/g)
1	0.87	3.8	0.8	5.2	80	25	38	11	0	0	1.4
2	0.95	3.8	0.8	7.4	93	74	41	4	31	0	5.7
3	0.87	3.8	3.2	4.8	83	34	34	10	0	0	1.2
4	0.95	3.8	3.2	5.9	89	55	45	3	9	4	1.9
5	0.87	12.2	0.8	3.9	40	6	18	7	7	7	1.2
6	0.95	12.2	0.8	7.5	100	53	82	9	76	2	9.6
7	0.87	12.2	3.2	3.8	27	14	8	0	2	6	1.1
8	0.95	12.2	3.2	6.1	100	12	63	2	76	1	3.2
9	0.85	8.0	2.0	4.2	79	23	24	13	0	22	1.0
10	0.98	8.0	2.0	7.7	100	7	100	2	73	0	8.2
11	0.92	8.0	0.0	6.0	100	100	16	30	0	1	7.2
12	0.92	8.0	4.0	4.3	60	8	49	6	2	3	1.3
13	0.92	1.0	2.0	5.1	82	30	38	20	17	3	1.6
14	0.92	15.0	2.0	6.2	94	6	51	4	60	0	1.9
15	0.92	8.0	2.0	5.7	68	0	50	10	8	4	1.6
16	0.92	8.0	2.0	5.3	85	9	57	14	19	0	1.6
17	0.92	8.0	2.0	5.0	70	4	44	14	8	4	1.0
18	0.92	8.0	2.0	4.4	82	16	66	4	8	0	0.8
19	0.92	8.0	2.0	5.3	82	6	70	12	2	0	1.0
20	0.92	8.0	2.0	5.5	98	10	26	4	52	0	1.2

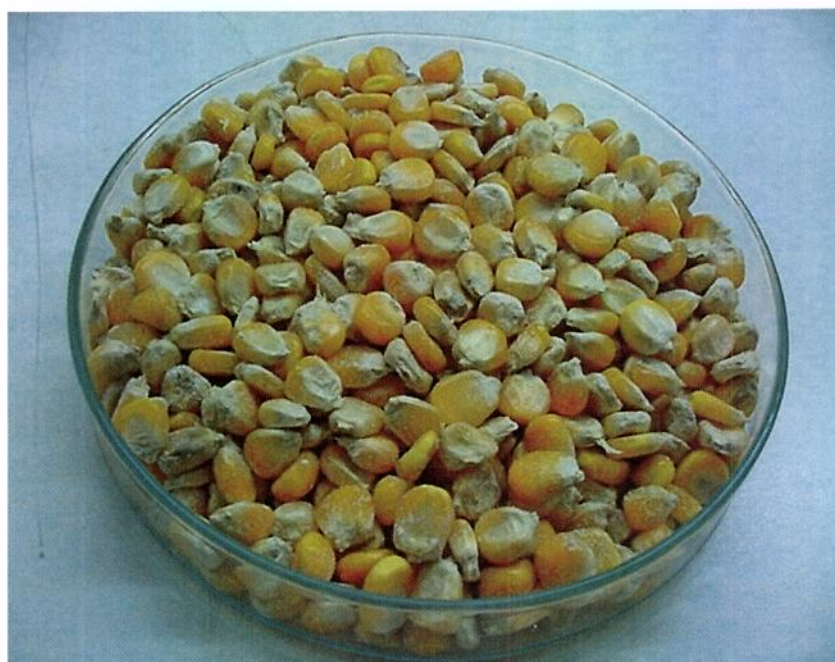


Figure 1A. Corn with extensive growth of yeasts and yeast-like moulds on the surface.

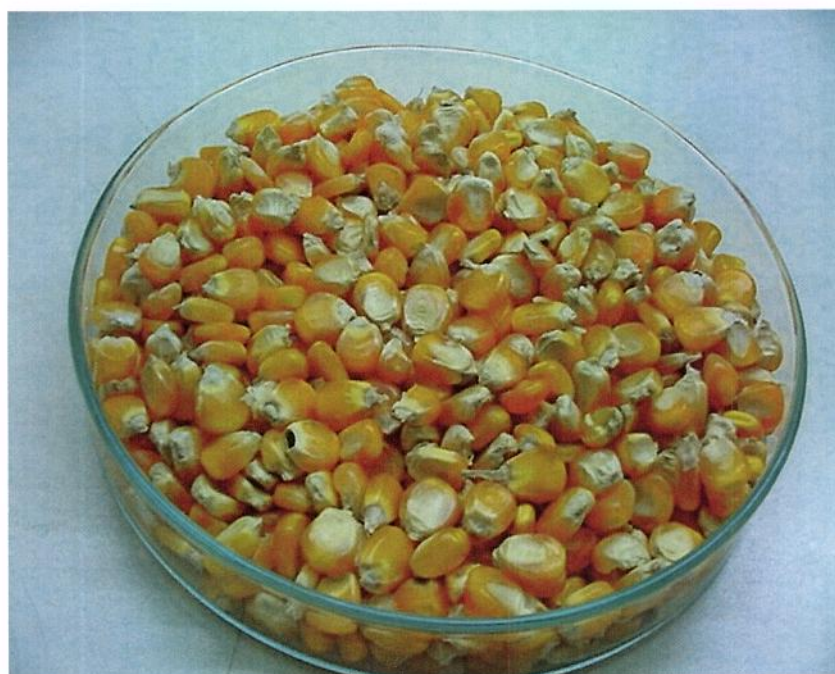


Figure 1B. Corn fumigated with phosphine.

The models and the determination coefficients (r^2) for the responses studied are shown in Table 3. In general the determinant coefficients were high. The analyses of variance (ANOVA) also showed that the calculated F values were higher than the tabulated F values, so the predictive real models well describe the experimental data obtained at the intervals of water activities, exposure time and phosphine concentrations studied .

Table 3. Models and determination coefficients (r^2) for the responses studied.

Response	Models	(r^2)
% of infected grains (p<0,15)	$= 443.75 - 377.94 a_w - 84.68 t - 5.00 PH_3 + 91.52 a_w t$	72.0%
Fungi counts (log CFU/g) (p<0,15)	$= 153.4 - 363.71 a_w + 221.44 a_w^2 + 5.39 PH_3 - 6.32 a_w PH_3$	84.7%
Ergosterol ($\mu\text{g/g}$) (p<0,1)	$= 648.15 - 1485.46 a_w + 854.83 a_w^2 - 3.218 t + 20.40 PH_3 + 0,73 PH_3^2 + 3.76 a_w t - 26.34 a_w PH_3 - 0.06 t PH_3$	97.8%

a_w = water activity

PH_3 = phosphine concentration ($\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$)

t = exposure period to the fumigant (days)

Figures 2, 3 and 4 show the response surfaces for grains internally infected by fungi (%), colony forming units (log) on DG18 agar medium and ergosterol contents ($\mu\text{g/g}$), when the water activity was fixed at 0.89, 0.92 and 0.95.

The surface responses were fixed at 0.89, 0.92 and 0.95 to provide a better evaluation of the effect of phosphine on grains with increasing water activity.

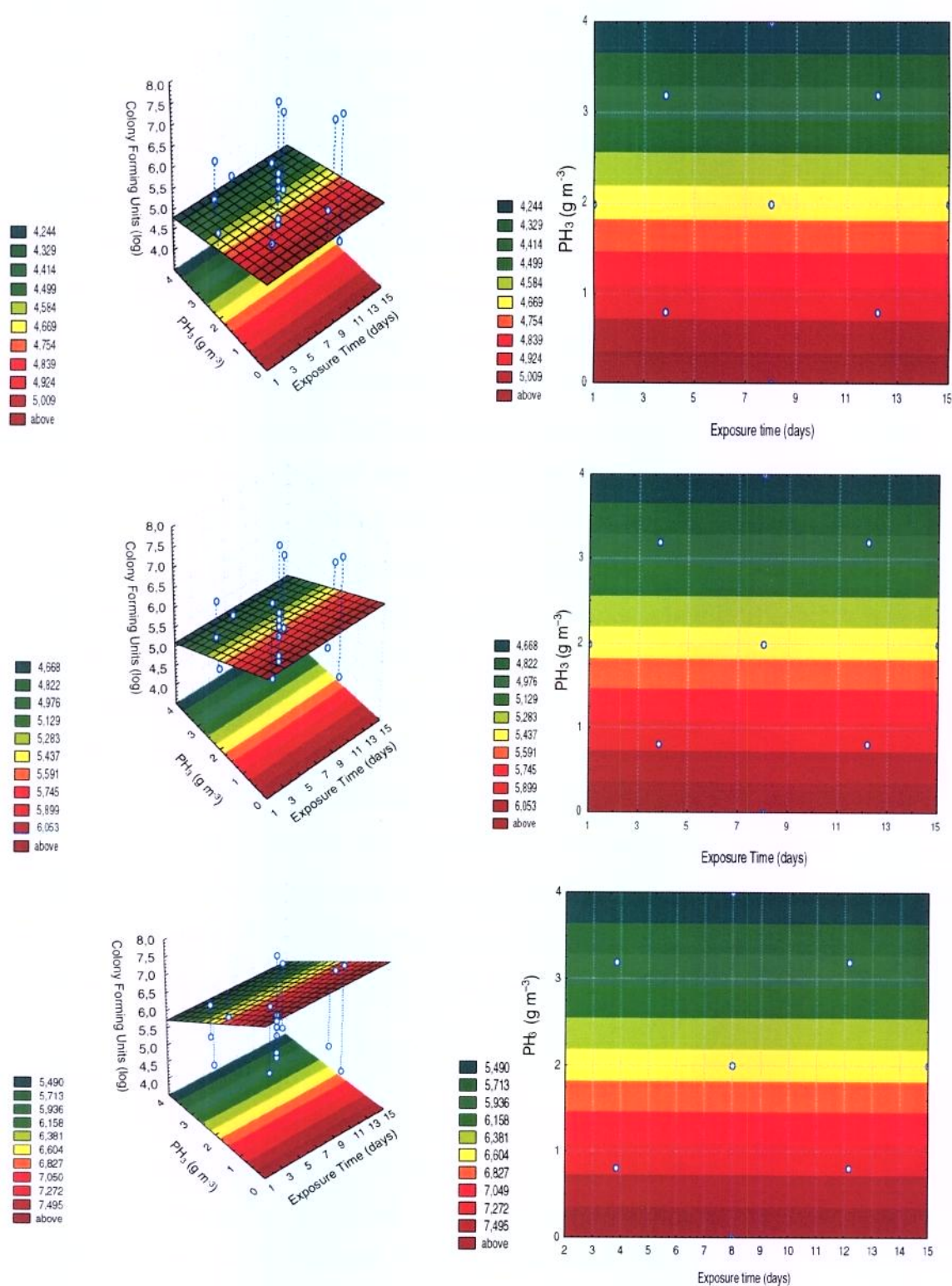


Figure 3. Response surfaces for colony forming units (cfu log) on DG18 agar medium as a function of exposure time and phosphine concentration in corn grains with water activities fixed at 0.89, 0.92 and 0.95 (equivalent to moisture contents of 16.2%, 19.2% and 21.6%, w.b.).

Figure 4 shows the ergosterol contents which varied from 0.8 to 9.6 µg/g. Water activity, phosphine concentration and the interactions between these three factors had significant effects on the ergosterol concentration. In comparison, the exposure time to the fumigant showed a smaller effect. This was also verified by the direct plating technique. As the water activity increases (above 0.92), the exposure time to the fumigant becomes more critical, higher phosphine concentrations are needed and the exposure time should be reduced.

Aflatoxin analyses

No aflatoxins were detected in the fumigated samples. In assay 13, where no phosphine was applied, the aflatoxin levels were 271.4 µg/kg and 24.3 µg/kg for aflatoxins B₁ and B₂, respectively. Castro, Pacheco and Taniwaki (1992) verified that a phosphine concentration of 0.5 g m⁻³ completely arrested aflatoxin production in high moisture shelled peanuts during a treatment period of 14 days in a laboratory-scale experiment.

Recently Castro *et al* (2001), also verified that a concentration of 0.2 g m⁻³ was sufficient to control aflatoxins in corn stored at 0.92 and 0.95 water activities, for up to 15 days. These results indicate that aflatoxin production by *Aspergillus flavus* is very sensitive to even low phosphine concentrations.

There are two brazilian regulations for aflatoxin limits in food and feeds:

- 30 µg/Kg aflatoxins B₁+G₁ (CNNPA 34/76 of the Ministry of Health) (Brasil, 1977).
- 20 µg/Kg aflatoxins B₁+B₂+G₁+G₂ (Regulation 183/96 of the Ministry of Agriculture). (Brasil, 1996).

In some situations it is difficult to comply with these limits for aflatoxins.

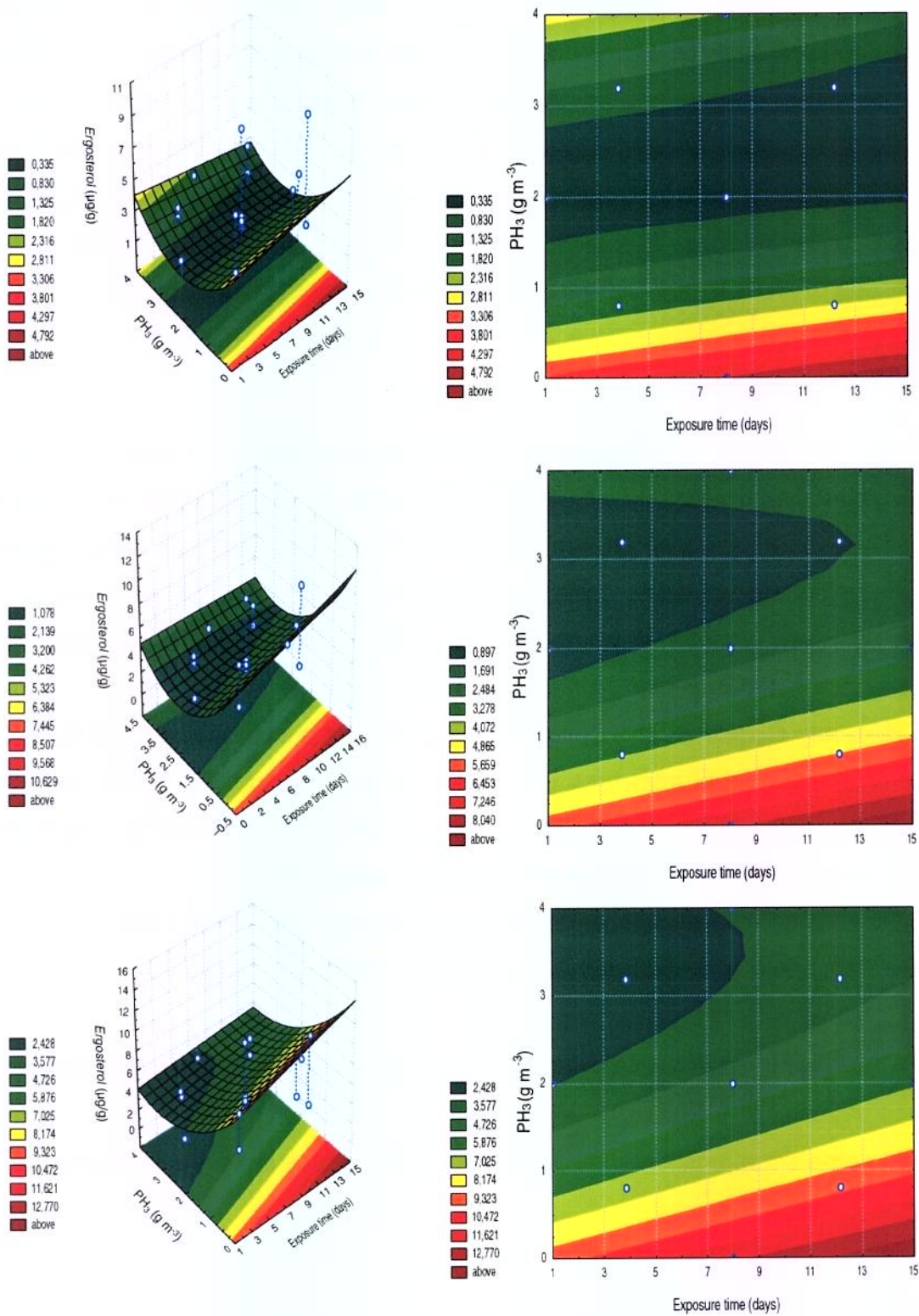


Figure 4. Response surfaces for ergosterol contents ($\mu\text{g/g}$) as a function of exposure time and phosphine concentration in corn grains with water activities fixed at 0.89, 0.92 and 0.95 (equivalent to moisture contents of 16.2%, 19.2% and 21.6%, w.b.).

DISCUSSION

All evaluation methods have their own limitations. The use of more than one methodology emphasizes the tendency of the effect of phosphine to decrease at very high water activities. Long exposure times, even at high concentrations, are not effective in preventing fungal growth, due to the prevalence of yeasts, yeast-like moulds and *Fusarium verticillioides*, which appear to be tolerant to phosphine.

There is a serious problem with phosphine resistance in at least 13 species of stored-product insects (Price and Mills, 1988; Taylor, 1989; Mills and Athié, 2000). Careful consideration will have to be given to dosage and exposure time recommendations for the use of phosphine applied for mycological reasons, when the product is also infested with insects. The use of phosphine in such a way may lead to selection for resistance, and this situation must be avoided. Should phosphine resistant insects be present, then the dosages and, particularly, the exposure times for their control, will have to be the determining factor in a phosphine fumigation strategy for high moisture content commodities. These doses do not cause a residue problem so there are ample possibilities for the integration of the use of phosphine for control of both fungi and insects.

ACKNOWLEDGMENTS

To FAPESP (Foundation for research support from the State of São Paulo) for the financial support of this research.

REFERENCES

- American Association of Cereal Chemists (1976). Approved Method of the American Association of Cereal Chemists. St. Paul, Min., USA.
- Bailly, J.R.; Leitão, J.; Cabrol-Telle, A. M. (1985). Effect antifongique du phosphore d'hydrogene sui diverses moisissures isolées de produits alimentaires. *Sciences des Aliments*, Serie V, **5**, 251-256.
- Bailly, J.R.; Leitão, J., Paillas, C. and G. de Saint Blanquet (1987). Modification de la flora fungique de produits alimentaires par l'emploi d'un fumigant: le PH_3 . Problème toxicologiques éventuels. *Sciences de Aliments*, Series VIII, **7**, 323-328.
- Box, G.E.P.; Hunter, W.G; Hunter, J.S. (1978). Statistics for experimenters: an introduction to design data analysis and model building. New York: John Wiley, 653p.
- Brasil. Leis, decretos, etc. Ministério da Saúde. Resolução nº34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Seção I, pt 1, p.710. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos, 19 jan.1977.
- Brasil. Leis, decretos, etc. Ministério da Agricultura. Portaria nº183, de 21 de mar.1996. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 de mar.1996. Art. 1. Adotar Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho, aprovado pela Resolução do Grupo Mercado Comum do Sul nº 56/94, de 01 jan.1995.
- Castro, M.F.P.P.M.; Pacheco, I. A.; Taniwaki, M.H. (1992). Effects of phosphine on aflatoxin production in peanuts stored with a high content. In: *Methyl Bromide Technical Options Workshop*. Washington, USA.

- Castro, M.F.P.P.M.; Pacheco, I.A. (1995). Utilization of the phosphine fumigant for the control of fungi naturally present in stored paddy rice (*Oryza sativa*, L.). *Revista de Microbiologia*, São Paulo, **26**, 230-235.
- Castro, M.F.P.P.M.; Soares, L.M.V.; Furlani, R.P. (1995). Mycoflora, aflatoxigenic species and mycotoxins in freshly harvested corn (*Zea mays*, L.): a preliminary study. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, **26**, pp. 289-295.
- Castro, M.F.P.P.M.; Pacheco, I.A.; Soares, L.M.V.; Furlani, R.P.Z. (1995). Phosphine fumigation of stored in-shell peanuts for the control of *A. flavus* (Link)/ *A. parasiticus* (Speare) growth and aflatoxins production. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, **26**, 296-301.
- Castro, M.F.P.P.M.; Pacheco, I.A.; Soares, L.M.V.; Furlani, R.P.Z.; Paula, D.C. de; Bolonhezi, S. (1996). Warehouse control of *A. flavus* (Link)/ *A. parasiticus* (Speare) on peanuts (*Arachis hypogaea*, L.) by phosphine fumigation and its effects on aflatoxin production. *Journal of Food Protection*, **59**, 407-411.
- Castro, M.F.P.M. de; Bragagnolo, N. and Valentini, S.R.T. (2002). The relationship between fungi growth and aflatoxin production with ergosterol content of corn grains. *Brazilian Journal of Microbiology*, **33**, 22-26.
- Castro, M.F.P.P.M.; Leitão, M.F.F.; Oliveira, J.J. do V.; Bragagnolo, N. Anichiárico, E.S. and Mills, K.A (2001). Effects of phosphine on the growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production in corn stored at different moisture contents. In: *Proceedings of the International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation*, Fresno, USA, v. 1, p.179-191.
- Castro, M.F.P.M. de, Bragagnolo, N.; Leitão, M.F.F.; Molina, C.V. and Alves, A.B. (2001). Determinação de ergosterol, por CLAE, em milho em grãos. *Brazilian Journal of Food Technology*, **4**, pp. 449-455.

- FAO (1975). Recommended methods for the detection and measurement of agricultural pests to pesticides: tentative method for adults of some major beetle pests of stored cereals with methyl bromide and phosphin, FAO method n° 16. *FAO Plant Protection Bulletin*, **23**, pp.12-24.
- Hocking, A.D.; Pitt, J.I. (1980). Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low moisture foods. *Applied Environmental Microbiology*, **39**, pp. 488-492.
- Hocking, A.D.; Banks, H.J. (1991a). Effects of phosphine fumigation on survival and growth of storage fungi in wheat. *Journal of Stored Product Research*, Oxford, **27**, pp. 115-120.
- Hocking, A.D.; Banks, H.J. (1991b). Effects of phosphine fumigation on the development of storage mycoflora in paddy rice. *In: Proc. 5th Int. Workin Conf. on Stored-product Protection* (Edited by Fleurat-Lessard, F. and Dicom, P.), Bordeaux, France, 1990, Imprimerie Médocaine, Blanquefort Cedex, France, pp.823-831.
- Mills, K.A.; Athie, I. (2000). Control of immature stages of phosphine susceptible and resistant strains of *Sitophilus oryzae* (L) by phosphine fumigation. *Brazilian Journal of Food Technolog: Preprint Serie*, n.51, pp. 171-176.
- Mislivec, P.B.; Tuite, J. (1970). Species of *Penicillium* occurring in freshly-harvested and in stored dent corn kernels. *Mycology*, **62**, pp. 67-74.
- Pitt, J.I.; Hocking, A.D.; Glenn, D.R.(1983). An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Applied Bacteriology*, **54**, pp.109-114.
- Price, L.A ; Mills, K.A. (1988).The toxicity of phosphine to the immature stages of resistant and susceptible strains of some common stored product beetles and

implications for their control. *Journal of Stored Product Research*, **24**, pp.51-59.

Raghunatan, A.N.; Majunder, S.K. (1969). Control of internal fungi of sorghum by fumigation. *Journal of Stored Products Research*, **5**, pp. 389-392.

Samson, R.A.; Hoekstra, E.S.; Vanoorschot, C.A.N. (1996). *Introduction to food-borne fungi*. 5 ed. [s.l.]: Centralbureau voor schimmelcultures, 247p.

Sinha, R.N; Berk, D.; Wallace, H.A.H. (1967).Effect of phosphine on mites, insects and microorganisms. *Journal of Economic Entomology*, **60**, pp.125-132.

Soares, L.M.V.; Rodrigues-Amaya, D.B. (1989).Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic. *Journal of Association of Official Analytical Chemistry*, **72**, 22-26.

Taylor, R.W.D. (1989). Phosphine: a major fumigant at risk. *International Pest Control*, **31**, 10-14.

Winston, P.W.; Bates,D.H. (1960). Saturated solutions for the control of humidity in biological research. *Ecology*, Tempe, USA, **41**, 232-235.

CAPÍTULO 5

THE RELATIONSHIP BETWEEN PHOSPHINE SORPTION AND FUNGAL CONTROL IN HIGH MOISTURE CORN GRAINS*

SUMMARY

The present study had as its objectives to verify the relationship between phosphine sorption and fungal control and, more specifically, the control of *Aspergillus flavus*, in corn grains stored at high moisture contents. The Response Surface Methodology was used in order to assess the various effects of phosphine on fungi and, in particular, on *Aspergillus flavus* in corn grains stored at water activities from 0.85 to 0.98 (equivalent to moisture contents from 15.3% to 24.5%, w.b.), phosphine concentrations from 0 to 4g m⁻³ and exposure times to the fumigant from 1 to 15 days. Analyses of moisture content, water activity and fungi were carried out in the samples submitted to the different treatments. Fungal analyses were performed using the direct plating technique on DG18 agar (for general fungal quantifications) and on AFPA agar medium (for the enumeration of *Aspergillus flavus*). Phosphine concentrations were measured by gas chromatography. The results showed that a relationship may exist between phosphine sorption and fungal control, and between phosphine sorption and *Aspergillus flavus* control depending, on the water activity of the grains. It was concluded that the sorbed phosphine may have some effect on fungi present and thus be a positive factor when the fumigation is aimed at controlling fungal growth.

Key words: grain storage; corn; phosphine sorption; fungal control; *Aspergillus flavus*

* Artigo publicado no *Brazilian Journal of Food Technology*, 5:79-86, 2002.

RELAÇÃO ENTRE SORÇÃO DE FOSFINA E CONTROLE DE FUNGOS EM MILHO EM GRÃOS ARMAZENADO COM ELEVADOS TEORES DE UMIDADE

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivos verificar a relação existente entre sorção de fosfina e o controle de fungos, e mais especificamente, com o controle de *Aspergillus flavus*, em milho em grãos armazenado com elevados teores de umidade. O planejamento experimental utilizado foi o da Metodologia de Superfície de Resposta com o propósito de determinar os diversos efeitos da fosfina sobre os fungos, em particular sobre *A. flavus*, em milho em grãos armazenado com atividades de água variando entre 0,85 a 0,98 (equivalente a conteúdos de umidade entre 15,3% e 24,5%, b.u.), concentrações de fosfina entre 0 a 4g m⁻³ e períodos de exposição ao fumigante de 1 a 15 dias. Foram realizadas análises de teor de umidade, atividade de água e de fungos nas amostras submetidas aos diferentes tratamentos. A análise de fungos foi realizada pelo método do plaqueamento direto dos grãos em DG18 agar e em AFPA agar (para contagem de *A. flavus*). As concentrações de fosfina foram determinadas por cromatografia gasosa. Os resultados indicaram que pode existir uma relação entre a sorção do fumigante fosfina e o controle de fungos e entre a sorção de fosfina e o controle específico de *A. flavus*, dependendo da atividade de água do grãos. Concluiu-se que a fosfina sorvida pelo grão pode ter algum efeito sobre os fungos presentes, e desse modo, atuar como um fator positivo no controle desses microrganismos.

Palavras-chave: grãos armazenados; milho; fosfina-sorção; fungos-controle; *Aspergillus flavus*.

1. INTRODUCTION

Phosphine, a fumigant widely used throughout of the world for insects control, has also been shown to be an alternative for fungal and mycotoxin control in grains stored with high moisture contents (HOCKING & BANKS, 1991a; HOCKING & BANKS, 1991b; CASTRO *et al*, 1992; CASTRO & PACHECO, 1995; CASTRO *et al.*, 1995; CASTRO *et al.*, 1996). The temporary storage of corn with high moisture contents is common under tropical conditions because the harvesting season sometimes coincides with the rainy season, and for this reason the product can not be sun-dried. In addition, the drying facilities are not available everywhere, or even if they are, they cannot fully meet the demands. Recent work on corn has shown the possibility of using phosphine fumigation for controlling *Aspergillus flavus* and aflatoxin production in high moisture corn grains (CASTRO *et al*, 2001). However, there is no information in the literature regarding a possible relationship between the sorbed phosphine and fungal control. Sorption is a term that includes both chemical sorption and physical sorption according to MCBAIN (1926) cited by BERCK & GUNTHER (1970) and influences distribution persistence, concentration-time relationships, bioactivity and interactions of fumigants with many kinds of substrate. It is known to be affected by particle size, moisture content and the nature of the substrate, as well as by fumigant dosage, temperature and contact time (LINDGREN & VINCENT, 1962, BERCK, 1964, 1965, cited by BERCK & GUNTHER, 1970). The objective of this study was to verify the existence of a possible relationship between fungal control and phosphine sorption and, more specifically, between *A. flavus* control and phosphine sorption in corn grains stored at water activities from 0.85 to 0.98 and exposed to phosphine concentrations from zero to 4.0g m⁻³ for 1 to 15 days.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Raw material

The experiments were conducted with the corn hybrid Cargill 606, freshly-harvested and sun-dried, grown at the Experimental Station of the Instituto Agronômico de Campinas, São Paulo, Brazil. The material (approximately 50kg) was cleaned, homogenized in a Boerner homogenizer and kept in the freezer at -20°C until the assays were set up. The corn was rehumidified to the desired level for each water activity (a_w), before the phosphine tests. The rehumidification was performed by adding amounts of distilled water, previously calculated, in order to increase the initial moisture content of the product to a water activity, corresponding to values of 0.85, 0.87, 0.92, 0.95 and 0.98.

2.2. Phosphine

Tablets of commercial aluminium phosphide GASTOXIN^{TM*}, each of 3g and which releasing 1g of phosphine, were used.

The phosphine was produced in a generator, according to the FAO method n°16 (ANON, 1975). The gas concentration inside the generator was analysed by gas chromatography using a flame photometric detector. A cylinder of phosphine with a purity of 99.99% was used as a reference to measure the phosphine concentration in the generator. The percentage of phosphine produced from the tablets was calculated by comparing the areas of the pure phosphine obtained from the cylinder with those obtained from the phosphine produced by the generator. This concentration of phosphine was assessed as 86%, and this value was used to calculate the required concentrations for the assays, considering that 1mL of phosphine (99.9%) was equivalent to 1.39mg of this gas.

* TM. Trade market.

At the end of the exposure times the gas concentrations inside the desiccators were measured again using gas chromatography. A phosphine standard curve was prepared and used to assess the phosphine concentration.

2.3. Inoculation with an *Aspergillus flavus* strain.

The corn samples were inoculated with a suspension of a toxigenic *Aspergillus flavus* strain obtained from our laboratory collection. The strain was previously isolated and tested for aflatoxin production. The spore suspension was prepared in flasks containing a phosphate buffer solution and Tween 80 and glass beads. The spore count was carried out using a microscope and a Neubauer chamber, in order to obtain 10^7 spores/mL. This suspension was sprayed on to the corn grains (1mL/300g) previously placed in glass containers.

2.4. Experimental design and statistical analyses

A second order rotational design with three factors and six repetitions at the central point was investigated by applying Response Surface Methodology (BOX *et al*, 1978). The factors and the level of each factor used in this study are shown in the design table (Table1) and include: water activities from 0.85 to 0.98, exposure times from 1 to 15 days and fumigant concentrations from 0.0 to 4.0gm^{-3} . The range intervals were selected for the various factors based on practical and published data. The results of the assays were analysed by the STATISTIC program version 6.0.

Table 1. Response surface methodology design

Assays	Coded			Real Values		
	Water activity	Time (days)	Phosphine dose (g m ⁻³)	Water activity	Time (days)	Phosphine dose (g m ⁻³)
1	-1	-1	-1	0.87	3.8	0.8
2	1	-1	-1	0.95	3.8	0.8
3	-1	-1	1	0.87	3.8	3.2
4	1	-1	1	0.95	3.8	3.2
5	-1	1	-1	0.87	12.2	0.8
6	1	1	-1	0.95	12.2	0.8
7	-1	1	1	0.87	12.2	3.2
8	1	1	1	0.95	12.2	3.2
9	-1.68	0	0	0.85	8.0	2.0
10	1.68	0	0	0.98	8.0	2.0
11	0	0	-1.68	0.92	8.0	0.0
12	0	0	+1.68	0.92	8.0	4.0
13	0	-1.68	0	0.92	1.0	2.0
14	0	+1.68	0	0.92	15.0	2.0
15	0	0	0	0.92	8.0	2.0
16	0	0	0	0.92	8.0	2.0
17	0	0	0	0.92	8.0	2.0
18	0	0	0	0.92	8.0	2.0
19	0	0	0	0.92	8.0	2.0
20	0	0	0	0.92	8.0	2.0

For each water activity the flasks containing the inoculated samples were distributed in 9L desiccators (1 flask/desiccator), containing approximately 500mL of the appropriate saturated salt solution. The salts used were potassium

dichromate ($0.98a_w$), lead nitrate ($0.95a_w$), sodium potassium tartrate ($0.92a_w$), sodium tartrate ($0.87a_w$) and potassium chloride ($0.85a_w$) in order to create environments with equilibrium relative humidities varying from 85 to 98% (WINSTON and BATES, 1960) in a free space volume of 8.7 litres. The desiccators were kept in a chamber with a controlled temperature of $25 \pm 2^\circ\text{C}$. According to the previously established experimental design, the samples were submitted to different phosphine treatments. Each assay was run three times. Immediately after the phosphine fumigation period the phosphine was dosed again and the samples taken out of the desiccators for the mycological analyses.

2.5. Analyses

2.5.1. Water activity and moisture content

The values of water activity of the samples were determined in a DECAGON apparatus model 2X-T. The moisture content determination was carried out with 15g of grains in an aerated oven at 120°C , for 72 hours (AACC, 1976).

2.5.2. Phosphine concentration

Phosphine concentrations were measured by gas chromatography. A phosphine standard curve was used to obtain the concentrations according to the integrated areas.

The gas chromatographic conditions were: Gas chromatograph HP 6890 with a flame photometric detector, temperature of 150°C , with a phosphorous filter (525nm), hydrogen flow of 150mL/min and air flow of 110mL/min. Capillary column 1909/j413 HP-5 with 5% phenyl methyl siloxane (30m x 320 μm x 0.25 μm) with a constant nitrogen flow of 2.0mL/min and a split injector (50:1) with make up at 60mL/min, both at 150°C . The chromatograph was linked to a computer (Chemstation) HP Vectra XA, which integrates peak areas and calculates concentrations. A sample volume of 20 μL was injected.

To prepare the phosphine standard curve the phosphine obtained in the generator, and previously assayed, was used. The range of the phosphine concentrations was from 0.0g m^{-3} to 4.0g m^{-3} . To achieve this concentration range, the phosphine gas was trapped in a glass tube or gas burette (40cm x 4.0cm diameter), completely full of water, with a screw-thread adaptor at the top, closed with silicone rubber and immersed in a beaker filled with water (previously boiled and degassed in an ultra-sonic apparatus for 10 minutes). From the gas burette, through the silicone septum, volumes of 1.5mL to 30mL of gas were removed with a gas-tight syringe (Hamilton model 1010 of 10mL) and injected to 9L capacity desiccators. Samples (20 μ L) were injected into the gas chromatograph from the desiccators with different phosphine concentrations.

The amount of phosphine sorption was obtained by measuring the phosphine concentration 10 minutes after dosing and again just before airing.

2.5.3. Fungal analyses

The direct plating methodology was used, in order to evaluate the percentage of grains internally infected with different fungi in addition to the *Aspergillus flavus* experimentally inoculated. The grains were immersed in 0.4% sodium hypochlorite solution for 1 minute and then rinsed with sterile distilled water. Fifty grains were plated (10 grains/plate) on the AFPA culture medium (PITT *et al.*, 1983) for *Aspergillus flavus* detection and on the DG18 medium (HOCKING & PITT, 1980) for the detection of xerophilic species. The fungal identification was carried out according to the methodology described by SAMSON *et al.* (1996).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Phosphine standard curve

The areas obtained after injections of 20 μ L of phosphine concentrations between 0.2 to 4.0g m^{-3} are shown in Table 2. Figure 1 shows the standard curve obtained from these data.

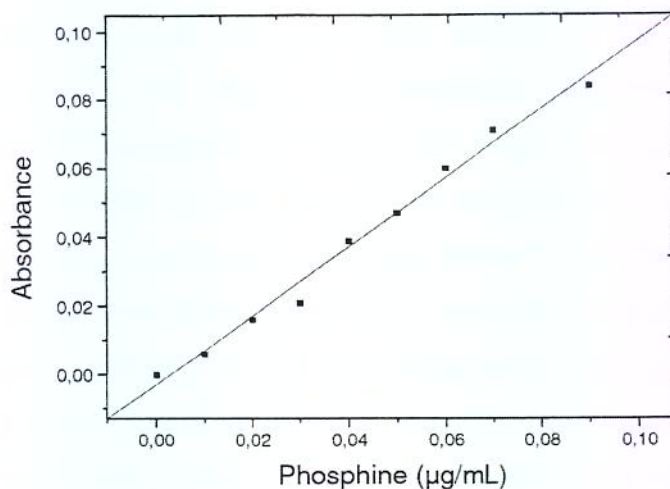


Figure 1. Phosphine standard curve.

Table 2. Areas obtained for the phosphine concentrations

Phosphine* (mL)	Phosphine concentration (g m^{-3})	Area (A)	SD ($\pm$)	VC (%)
1.5mL	0.2 g m^{-3}	1078.4	10.5	0.9
6.0mL	0.8 g m^{-3}	6627.2	41.4	0.6
9.0mL	1.2 g m^{-3}	13683.9	97.8	0.7
12.0mL	1.6 g m^{-3}	16632.1	1139.5	6.8
15.0mL	2.0 g m^{-3}	18493.4	955.0	5.1
18.0mL	2.4 g m^{-3}	25461.8	1070.2	4.2
21.0mL	2.8 g m^{-3}	28458.5	843.0	2.9
24.0mL	3.2 g m^{-3}	31585.2	196.0	0.6
27.0mL	3.6 g m^{-3}	33184.8	203.0	0.6
30.0mL	4.0 g m^{-3}	37791.6	358.4	0.9

* Volume of phosphine produced by the phosphine generator and injected into the desiccator in order to obtain phosphine concentrations from 0.2 to 4.0 g m^{-3} .

A - Average of three replicate injections. SD - standard deviation. VC- variation coefficient

3.2. Fungal and phosphine analyses

The results of the fungal and phosphine analyses are shown in Table 3.

Table 3. Percentage of grains internally infected by fungi and by *Aspergillus flavus* and phosphine sorption (g m^{-3}) in corn grains stored with different water activities and exposed to different phosphine concentrations for different periods.

Assays	Water activity	Exposure time (days)	Phosphine (g m^{-3})	Infected grains (%)	<i>A. flavus</i> (%)	Phosphine sorbed (g m^{-3})
1	0.87	3.8	0.8	80	13	0.1
2	0.95	3.8	0.8	93	91	0.1
3	0.87	3.8	3.2	83	28	0.4
4	0.95	3.8	3.2	89	34	0.3
5	0.87	12.2	0.8	40	3	0.1
6	0.95	12.2	0.8	100	47	0.4
7	0.87	12.2	3.2	27	4	0.7
8	0.95	12.2	3.2	100	7	1.1
9	0.85	8.0	2.0	79	9	0.3
10	0.98	8.0	2.0	100	6	1.5
11	0.92	8.0	0.0	100	100	0.0
12	0.92	8.0	4.0	60	3	0.4
13	0.92	1.0	2.0	82	16	0.1
14	0.92	15.0	2.0	94	7	0.6
15	0.92	8.0	2.0	68	2	0.3
16	0.92	8.0	2.0	85	1	0.5
17	0.92	8.0	2.0	70	8	0.2
18	0.92	8.0	2.0	82	6	0.5
19	0.92	8.0	2.0	82	0	0.6
20	0.92	8.0	2.0	98	8	0.3

In addition to *Aspergillus flavus*, which was experimentally inoculated, the fungal species detected on DG18 agar medium in the fumigated samples were *Fusarium verticillioides*, *Penicillium* spp (*P. variable*, *P. citrinum*, *P. funiculosum*, *P. pinophilum*), other filamentous fungi, yeasts and “yeast-like fungi” (*Geotrichum* spp and others not identified). These fungi are commonly found in freshly harvested grains and the yeasts and yeast-like fungi are generally present in grains with high moisture contents. No *Eurotium* spp was detected in the samples submitted to the phosphine treatments. The highest phosphine sorption was observed in the grain with the highest water activity and exposure period, a result which is to be expected.

The models and the determination coefficients (r^2) for the responses studied are shown in Table 4. The determination coefficients for the response *Aspergillus flavus* (AFPA) was high and the analyses of variance showed that the predicted model (real) was valid as the calculated F value for the regression (7.23) was higher than the tabulated F value (2.4). The predicted models (real) for the responses infected grains and phosphine sorption were also valid, as the calculated F values were, respectively, 9.52 and 7.82 (higher than the tabulated values 2.36 and 2.28, respectively).

Table 4. Models and determination coefficients (r^2) for the responses studied.

Response	Real model ($p < 0.1$)	(r^2)
<i>Aspergillus flavus</i> (%) (AFPA)	$= 132.74 - 1097.87 a_w + 1178.60 a_w^2 + 13.48 t + 0.21 t^2 + 235.36 PH_3 + 12.58 PH_3^2 - 20.75 a_w \cdot t - 328.95 a_w \cdot PH_3$	84.0%
Infected grains (%)	$= 443.75 - 377.94 a_w - 84.68 t - 5.00 PH_3 + 91.52 a_w t$	72.0%
Phosphine sorption	$= 102.20 - 30.20 a_w + 128.91 a_w^2 + 20.039 t + PH_3 0.374 - 0.06 PH_3^2$	78.3%

a_w = water activity

PH_3 = phosphine concentration ($g \cdot m^{-3}$)

t = exposure period to the fumigant (days)

All effect analyses were carried out at within a confidence limit of 90% according to the pure error. For the percentage of grains internally infected by *Aspergillus flavus* the effect analyses showed that only the interaction between the exposure period and phosphine concentration did not affect the response, and thus this term was excluded from the model. An increase in the exposure period to the fumigant and mainly in the phosphine concentration, will decrease the percent of grains internally infected by this species. For grains internally infected by fungi, the significant effects were mainly the interaction between water activity and exposure period to phosphine (positive effect) followed by water activity, exposure period to phosphine and phosphine concentration. As water activity and exposure period to the fumigant increased the grains internally infected by fungi also increased. The water activity, exposure time and phosphine concentration all had positive effects on phosphine sorption by the grains, i.e., with an increase in the value of these variables, phosphine sorption also increased.

Figures 2, 3 and 4 show the response surfaces for phosphine sorption, percentage of total grains internally infected by fungi and the percentage of grains internally infected by *Aspergillus flavus* and detected on AFPA agar medium. They were obtained when the water activity levels were fixed at 0.89, 0.92 and 0.95.

Figure 2 shows that when the water activity was fixed at 0.89, phosphine sorption varied from 0.0 to 0.6g m⁻³. The area of maximum phosphine sorption by corn grains was obtained after approximately 11 days of exposure at phosphine concentrations above 2.5g m⁻³. The percentage of grains internally infected by fungi ranged from around 44% to 100%. The lowest percentage of grains internally infected by fungi was after 13.5 days at phosphine concentrations above 3.5g m⁻³. The percentage of grains internally infected by *Aspergillus flavus* varied from 8 to 100%, the minimum values were reached at between an exposure time of 6 and 15 days and phosphine concentrations of 1.5 to 3.0g m⁻³. The area of maximum sorption by the grain at this water activity coincided with the area of minimum percentage of total grains internally infected by fungi so it is probable that in this case a relationship may exist between phosphine sorption and control of fungi.

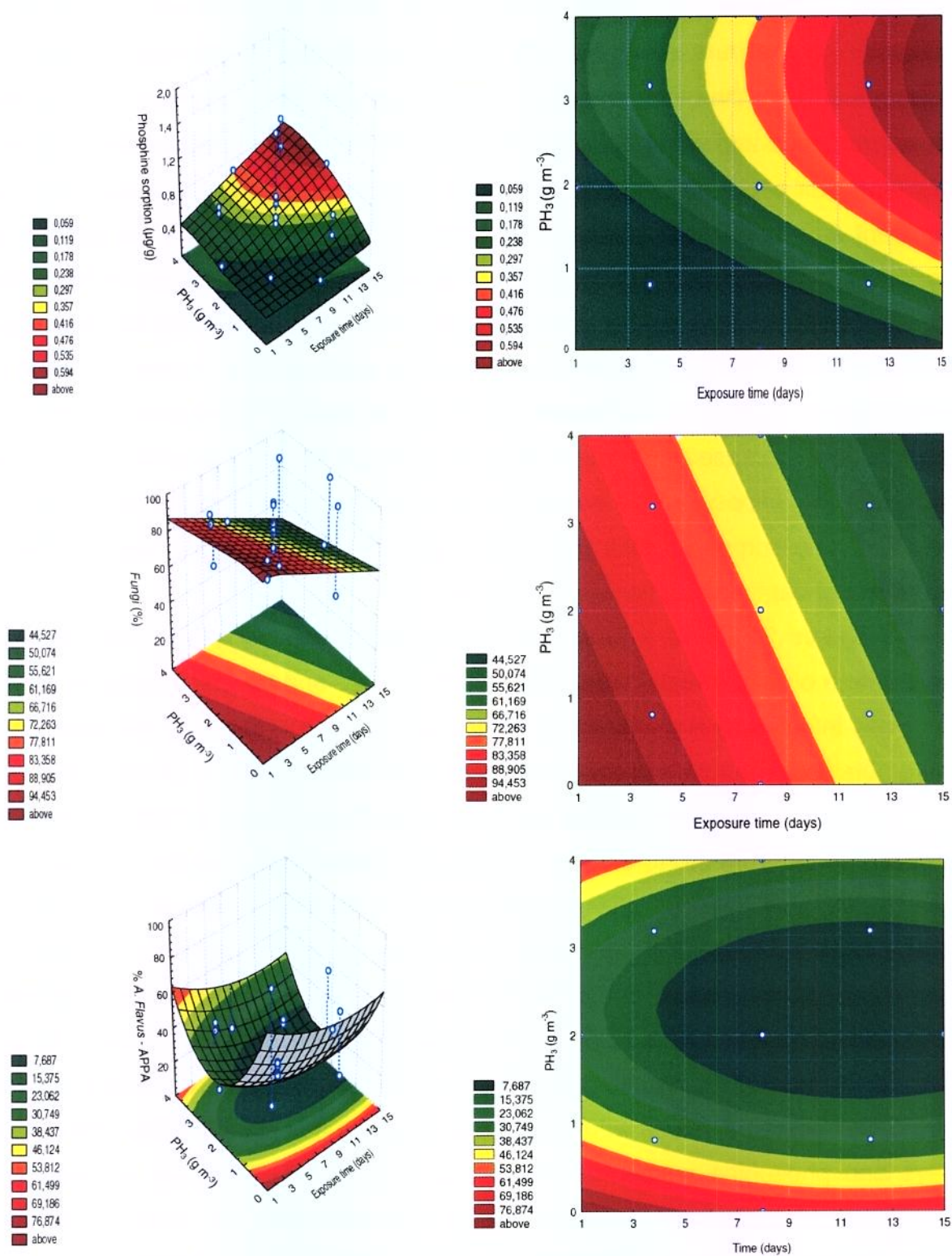


Figure 2. Response surfaces for phosphine sorption (above), percentage of grains internally infected by fungi (middle) and by *Aspergillus flavus* (below) as a function of exposure time and phosphine concentration in corn grains at 0.89 a_w

Figure 3 shows that when water activity was fixed at 0.92 phosphine sorption varied from 0.07 to 0.7. At this water activity the range of maximum sorption was achieved after exposure times of around 11 days and phosphine concentrations above 2.5g m^{-3} . The percentage of grains internally infected by fungi varied from between 71% and 100%. The lowest percentage of grains internally infected by fungi was achieved after eleven days at phosphine concentrations above 3.8g m^{-3} . At this water activity, grains internally infected by *A. flavus* varied from between 9% and 100%. The minimum percentage of grains internally infected by *Aspergillus flavus* was achieved with exposure times exceeding 7.5 days and phosphine concentrations between 1.8 and 3.5g m^{-3} . Again the area of maximum sorption by the grain at this water activity coincided with the area of minimum percentage of total grains internally infected by fungi, so it is probable that in this case, a relationship may exist between phosphine sorption and the control of fungi.

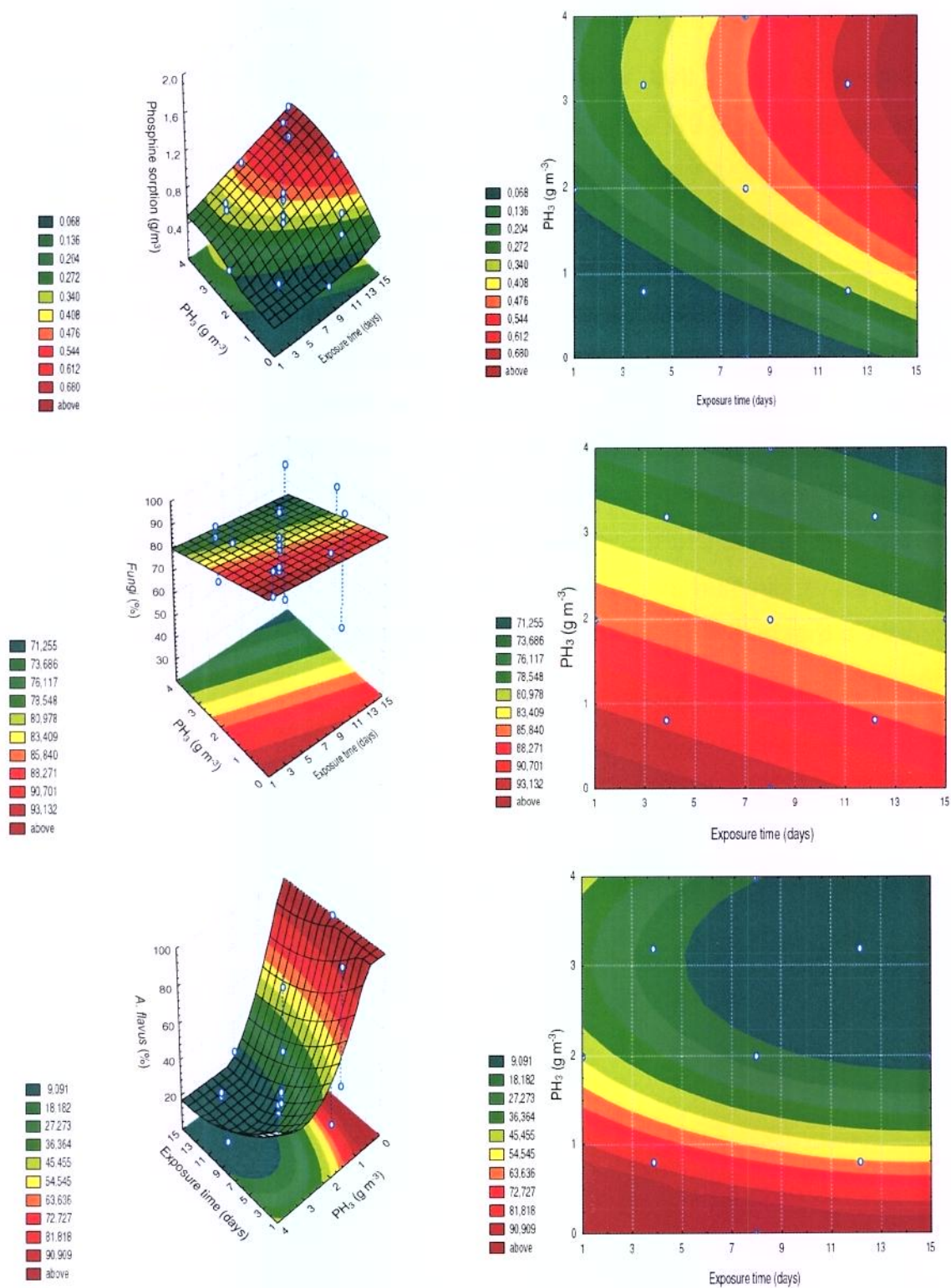


Figure 3. Response surfaces for phosphine sorption (above), percentage of grains internally infected by fungi (middle) and by *Aspergillus flavus* (below) as a function of exposure time and phosphine concentration in corn grains at 0.92 a_w

Figure 4 shows that phosphine sorption ranged from 0 to 1g m^{-3} when water activity was fixed at 0.95. The maximum phosphine sorption by the grains was achieved after an exposure time of 12 days and phosphine concentration from 2.2 to 4.0g m^{-3} . The percentage of grains internally infected by fungi varied from 70% to 100%. The lowest percentage of grains infected by fungi was achieved with exposure times of 1 to 4 days and phosphine concentrations above 3.5g m^{-3} . The minimum percentage of grains internally infected by *Aspergillus flavus* was achieved between 8 and 15 days of exposure at phosphine concentrations above 2.0g m^{-3} . The percentage of grains internally infected by *A. flavus* varied from 9 to 90%. At this water activity the area of maximum sorption coincided with the area of the minimum percentage of grains internally infected by *Aspergillus flavus*. The overlay of the graphs for *Aspergillus flavus* and phosphine sorption clearly show this relationship.

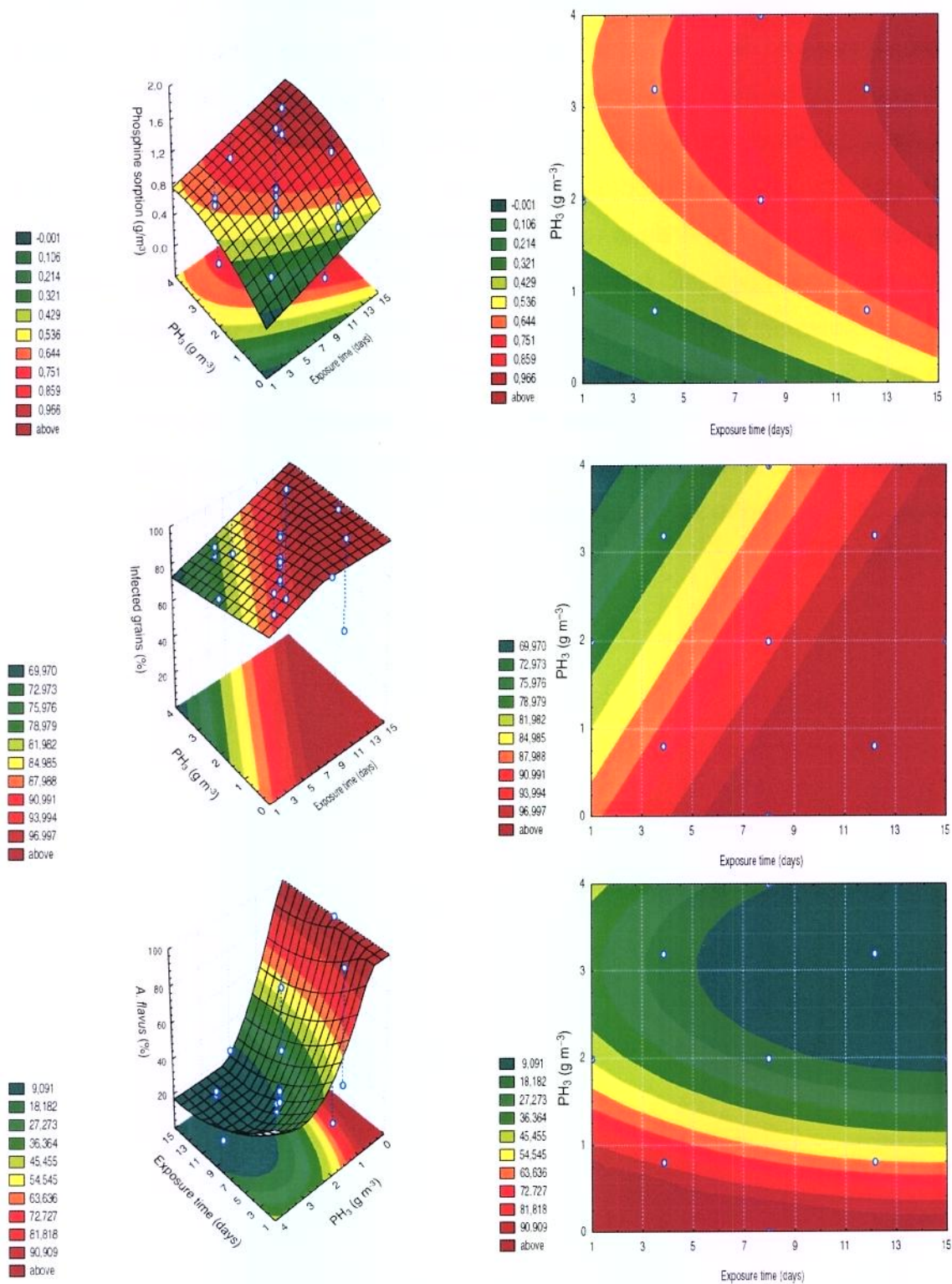


Figure 4. Response surfaces for phosphine sorption (above), percentage of grains internally infected by fungi (middle) and by *Aspergillus flavus* (below) as a function of exposure time and phosphine concentration in corn grains at 0.95 a_w

In normal fumigation practice, phosphine concentrations between 0.1 and 0.5g m⁻³, and exposure times of 3 to 16 days are recommended to control insects, varying according to the temperature. VALENTINI *et al.* (1996) Sorption is a cause of concentration loss and so less fumigant is left for the control of insects.

Previous papers have shown that phosphine can also be used for fungal and mycotoxin control. In this case phosphine sorption by the grain could be of benefit, as the fungi are on the inside of the grains.

Unlike studies on insects there is no study on how phosphine controls the fungi. It is uncertain if the action is due to the phosphine in the free spaces or that which is adsorbed by the grain or both. Our study shows that for corn grains, depending on the water activity, a relationship may exist between the phosphine sorbed and the control of fungi as measured by the direct plating technique. More studies are needed to verify if control by the sorbed phosphine is species dependent.

4. CONCLUSION

Based on the prevailing experimental conditions, we concluded that, depending on the water activity of the grain, a relationship may exist between fungal control and the phosphine sorbed by the grains, and more specifically, between *Aspergillus flavus* control and phosphine sorption.

5. REFERENCES

ANON. Recommended methods for the detection and measurement of agricultural pests to pesticides. Tentative method for adults of some major beetle pests of stored cereals with methyl bromide and phosphine. FAO method n°16. **FAO Plant Protection Bulletin**, 23(1): 12-24, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1975, FAO, Roma, Italy.

- AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. Approved Method of the American Association of Cereal Chemists, St. Paul, 1976.
- BERCK, B., GUNTHER, F. A Rapid determination of sorption affinity of phosphine by fumigation within a gas chromatographic column, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, (1):148-153, 1970.
- BOX, G.E.P., HUNTER, W.G., HUNTER, J.S. Statistics for experimenters. An introduction to design data analysis and model building. New York, John Wiley. 1978.
- CASTRO, M.F.P.P.M. de, PACHECO, I.A., TANIWAKI, M.H. Effects of phosphine on aflatoxin production in peanuts stored with a high content. In: **Proceedings of the Methyl Bromide Technical Options Workshop**. Washington, USA, 1992.
- CASTRO, M.F.P.P.M. de; PACHECO, I.A. Utilization of the phosphine fumigant for the control of fungi naturally present in stored paddy rice (*Oryza sativa*, L), **Revista de Microbiologia**, São Paulo, **26**(3): 230-235, 1995.
- CASTRO, M.F.P.P.M. DE; PACHECO, I.A., SOARES, L.M.V., FURLANI, R.P.Z. Phosphine fumigation of stored peanuts for *A.flavus* (Link) and *A .parasiticus* (Speare) and aflatoxins control. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, **26**(4):296-301, 1995.
- CASTRO, M.F.P.P.M. de; PACHECO, I.A., SOARES, L.M.V., FURLANI, R.P.Z., PAULA, D.C. DE, BOLONHEZI, S. Warehouse control of *A. flavus* (Link) and *A. parasiticus* (Speare) on peanuts *Arachis hypogaea*, L. by phosphine fumigation and its effects on aflatoxin production. **Journal of Food Protection**, **59** (4): 407-411, 1996.

- CASTRO, M. F. P. M. de ; LEITÃO, M. F. F.; OLIVEIRA, J. J. do V.,
ANICHIÁRICO, E. S., YOTSUYANAGI, K.; MILLS, K. A. Effects of phosphine on the growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production in corn grains stored at different moisture contents. In: **Proceedings of the International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products**, Fresno, USA, 2001, v.1, p.179-191.
- HOCKING, A.D.; PITT, J.I. Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low moisture foods. **Applied and Environmental Microbiology**, **39**: 488-492, 1980.
- HOCKING, A. D., BANKS, H. J. Effects of phosphine fumigation on survival and growth of storage fungi in wheat. **Journal of Stored Product Research**, **41** (1): 232, Oxford, 1991a.
- HOCKING, A. D., BANKS, H. J. Effects of phosphine fumigation on the development of storage mycoflora in paddy rice. In: **Proceedings of the International Working Conference on Stored-Protection**, 5, Bordeaux, France, p. 823-31, 1991b.
- MCBAIN, J.W. , Nature, 117, 550 (1926). APUD. BERCK; GUNTHER, F.A. Rapid determination of sorption affinity of phosphine by fumigation within a gas chromatographic column. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, **18** (1):148-153, 1970.
- PITT, J. I., HOCKING, A. D., GLENN, D.R. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Applied Bacteriology**, **54**: 109-14, 1983.
- SAMSON, R. A, HOEKSTRA, E. S., VANOORSCHOT, C.A. N. **Introduction to food-borne fungi** [s.l.]:5ed. Centralbureau voor schimmelcultures, 1996. 247p.

VALENTINI, S.R.T., GOMES, R.A R., VERDADE, S.B., ATHIÉ, I., CASTRO, M.F.P.M. de. Eficiência de lonas de PVC e polietileno para fumigação de grãos com fosfina. **Coletânea do ITAL**, Campinas, **26**(2):155-160, 1996.

WINSTON, P.W; BATES, D.H. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. **Ecology**, Tempe, USA, **41**(1): 232-5, 1960.

ACKNOWLEDEGMENTS

To Fapesp (Foundation for Research Support of the State of São Paulo) for the financial support of this research.

CAPÍTULO 6

SORÇÃO DE FOSFINA E AVALIAÇÃO DOS SEUS NÍVEIS RESIDUAIS EM MILHO EM GRÃOS COM ELEVADO TEOR DE UMIDADE*

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram verificar os níveis de sorção de fosfina e avaliar os níveis residuais desse fumigante em milho em grãos com elevado teor de umidade. A sorção de fosfina foi determinada pela diferença entre as concentrações inicialmente aplicadas e aquelas determinadas após os diferentes períodos de exposição às mesmas. A técnica da Metodologia de Superfície de Resposta foi utilizada, de modo a se obter os níveis de sorção e de resíduo desse fumigante, quando aplicado em milho com atividade de água de 0,85 a 0,98, exposto a concentrações de 0 a 4g m⁻³ de fosfina por 1 a 15 dias. Os resíduos de fosfina foram quantificados por espectrofotometria no comprimento de onda de 400nm. Amostras de milho isentas de fosfina e fortificadas com este gás nas concentrações de 0,5µg/g e 1,0µg/g apresentaram recuperações nas faixas de 94% a 116% e 95% a 117%, respectivamente. Os níveis de sorção de fosfina aumentaram com o teor de umidade e com a concentração do fumigante; no entanto, nenhum resíduo de fosfina foi detectado no milho dentro do limite de quantificação do método que é de 0,1µg/g e, portanto, não foi possível a obtenção de superfícies para essa resposta. Em relação aos resultados obtidos, concluiu-se que o uso da fosfina com a finalidade de controlar fungos em milho com elevado teor de umidade não apresenta impedimentos sob o ponto de vista de segurança alimentar, visto que esse fumigante não deixa resíduos no produto.

Palavras-chave: Milho, fumigação, fosfina-resíduo, fosfina-sorção.

* Artigo publicado no *Brazilian Journal of Food Technology*, 5: 87-93, 2002

PHOSPHINE SORPTION AND EVALUATION OF ITS RESIDUE LEVELS IN CORN GRAINS WITH HIGH MOISTURE CONTENTS

SUMMARY

The objectives of this research were to verify the sorption levels of phosphine and to evaluate the residual levels of this fumigant in corn grains with high moisture content. Phosphine sorption was determined from the difference between the concentrations initially applied and those determined after different periods of exposure to each treatment. Response Surface Methodology technique was used in order to determine the sorption and residue levels of this fumigant when applied to corn with water activities from 0.85 to 0.98, exposed to phosphine concentrations of 0 to 4g m^{-3} for 1 to 15 days. The phosphine residues were quantified by spectrophotometry at a wave length of 400 nm. Corn samples containing no phosphine and fortified with this gas at concentrations of $0.5\mu\text{g/g}$ and $1.0\mu\text{g/g}$, showed recoveries in the range of 95% to 117% and 94% to 116%, respectively. The sorption levels of phosphine increased with the moisture content and with fumigant concentration. However, no phosphine residue was detected in the grains, the quantification limit for the method which is up to $0.1\mu\text{g/g}$, so that it was not possible to obtain a response surface for this parameter. It was concluded that the use of phosphine with the aim of controlling fungi in corn with a high moisture content, had no restrictions with respect to food safety, since this leaves no residues in the product.

Key-words: Corn, fumigation, phosphine-residue, phosphine-sorption

1. INTRODUÇÃO

O milho é o cereal mais importante cultivado no Brasil. Condições climáticas desfavoráveis ou falta de infra-estrutura adequada podem impossibilitar a secagem desse cereal até limites considerados seguros para a sua estocagem. A manutenção de teores de umidade e temperatura elevadas favorecem o crescimento de *Aspergillus flavus* e a produção de aflatoxinas nesse produto, tornando-o inadequado para consumo humano ou animal.

A fosfina, um fumigante amplamente utilizado para o controle de insetos, tem se apresentado como uma alternativa viável para controlar fungos e micotoxinas em grãos armazenados com elevados teores de umidade (CASTRO, PACHECO, 1995, CASTRO *et al.*, 1992, CASTRO *et al.*, 1995, CASTRO *et al.*, 1996, HOCKING, BANKS, 1991a, HOCKING, BANKS, 1991b).

Recentemente CASTRO *et al.* (2001), estudaram o efeito da fosfina no controle de *Aspergillus flavus* e na produção de aflatoxinas em milho úmido e determinaram as condições de fumigação necessárias para se obter controle daquela espécie fúngica e evitar a produção de aflatoxinas, sem contudo avaliar os níveis de sorção e de resíduos no produto fumigado. No entanto, sabe-se que dependendo das condições ambientais, da umidade das amostras e da maneira como é realizada a fumigação, diferentes teores de fosfina podem ser sorvidos pelos grãos (BERCK, GUNTHER, 1970, SALEM, M'NAOUAR, 1991). Sorção é um termo que inclui tanto a sorção química quanto a física de acordo com MC BAIN (1926) citado por BERCK, GUNTHER (1970).

Apesar da importância tecnológica do uso da fosfina para evitar a produção de micotoxinas, existe o risco da mesma, por meio do fenômeno de sorção, atingir concentrações nos grãos que possam acarretar danos a saúde do consumidor.

Em função destes aspectos, os objetivos deste trabalho foram verificar os níveis de sorção de fosfina em milho em grãos com elevado teor de umidade e avaliar os níveis residuais desse fumigante no produto submetido à fumigação.

2. METODOLOGIA

2.1 Material

Foi utilizado o milho híbrido Cargill 606 obtido da Estação Experimental do Instituto Agrônomo de Campinas.

O resíduo de fosfina foi avaliado em amostras de milho submetidas à fumigação nas condições estudadas por CASTRO *et al.* (2001), conforme descrito a seguir.

2.2. Planejamento Experimental

Amostras de 300g de milho com teores de umidade de 15,3% a 24,5%, correspondentes à atividade de água de 0,85 e 0,98, respectivamente, foram inoculadas com *Aspergillus flavus* e acondicionadas em dessecadores de 9 litros hermeticamente fechados. Nos dessecadores, foram colocados aproximadamente 300mL de solução saturada de $K_2Cr_2O_7$ (98% de U.R.), nitrato de chumbo (95% de U.R.), tartarato de sódio e potássio (92% de U.R.), tartarato de sódio (87% de U.R.) e cloreto de potássio (85% de U.R.) em diferentes concentrações, de modo a garantir ambientes com umidades relativas variando de 85% a 98% e volume livre de 8,7L. Os dessecadores foram mantidos em uma câmara com temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ C$.

De acordo com o delineamento experimental previamente estabelecido, as amostras foram submetidas à fumigação por períodos que variaram de 1 a 15 dias, sendo expostas a concentrações de fosfina que variaram de 0 a $4,0 \text{ g m}^{-3}$. Os ensaios foram feitos em triplicata e a média considerada como resultado final. A fosfina foi introduzida nos dessecadores através do orifício da tampa fechado com silicone. A tampa do dessecador foi untada com graxa de silicone e envolvida com fita adesiva para vedação do sistema.

Logo após o período de fumigação com fosfina, as amostras foram coletadas e mantidas em freezer para análises de resíduos.

Foi utilizada a técnica da Metodologia de Superfície de Resposta e o delineamento rotacional de segunda ordem com 3 fatores e 6 repetições no ponto central (BOX *et al.*, 1978) como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Delineamento rotacional de segunda ordem com 3 fatores e 6 repetições no ponto central (Superfície de Resposta).

Codificado					Valores Reais		
Ensaios	Atividade de água	Tempo (dias)	Dose de fosfina (g m^{-3})		Atividade de água	Tempo (dias)	Dose de fosfina (g m^{-3})
1	-1	-1	-1		0,87	3,8	0,8
2	1	-1	-1		0,95	3,8	0,8
3	-1	-1	1		0,87	3,8	3,2
4	1	-1	1		0,95	3,8	3,2
5	-1	1	-1		0,87	12,2	0,8
6	1	1	-1		0,95	12,2	0,8
7	-1	1	1		0,87	12,2	3,2
8	1	1	1		0,95	12,2	3,2
9	-1,68	0	0		0,85	8,0	2,0
10	1,68	0	0		0,98	8,0	2,0
11	0	0	-1,68		0,92	8,0	0,0
12	0	0	+1,68		0,92	8,0	4,0
13	0	-1,68	0		0,92	1,0	2,0
14	0	+1,68	0		0,92	15,0	2,0
15	0	0	0		0,92	8,0	2,0
16	0	0	0		0,92	8,0	2,0
17	0	0	0		0,92	8,0	2,0
18	0	0	0		0,92	8,0	2,0
19	0	0	0		0,92	8,0	2,0
20	0	0	0		0,92	8,0	2,0

2.3. Análise de resíduos de fosfina

A. Padrão de fosfina e solução de nitrato de prata

Utilizaram-se pastilhas de fosfeto de alumínio (Gastoxin-Casa Bernardo) que liberaram o gás fosfina na concentração de 86%. Este gás diluído foi utilizado tanto para a fumigação do milho em dessecadores como para elaboração da curva-padrão. Nas condições Normais de Temperatura e Pressão (CNTP) há 1,20mg de fosfina em 1mL do gás liberado pela pastilha de fosfeto de alumínio (RANGASWAMY, 1984).

Pesou-se 0,075g de AgNO_3 e dissolveu-se em 50,0mL de água deionizada. Retirou-se uma alíquota de 5mL e transferiu-se para um balão volumétrico de 250mL completando-se o volume com água.

B. Sistema coletor de fosfina (SCF) e tubo de diluição de fosfina (TDF)

Para uso do padrão do gás fosfina foi utilizado um sistema coletor de fosfina (SCF) consistindo de um becker de 2 litros, um tubo com tampa de rosca de baquelite com um orifício fechado com silicone e septo de borracha e a outra extremidade aberta. Para diluição do gás, utilizou-se de um tubo de diluição de fosfina (TDF) de 70,5mL (2cm x 20cm) hermeticamente fechado (Figura 1).

O tubo completamente cheio de ácido sulfúrico (5%) foi mergulhado até a metade, com a extremidade aberta para baixo, em um becker com a mesma solução ácida. A pastilha de fosfeto de alumínio foi colocada abaixo da extremidade aberta do tubo para possibilitar que o gás fosfina evoluído se depositasse na parte superior do tubo, por onde eram retiradas alíquotas do gás, com seringa *gastight*.

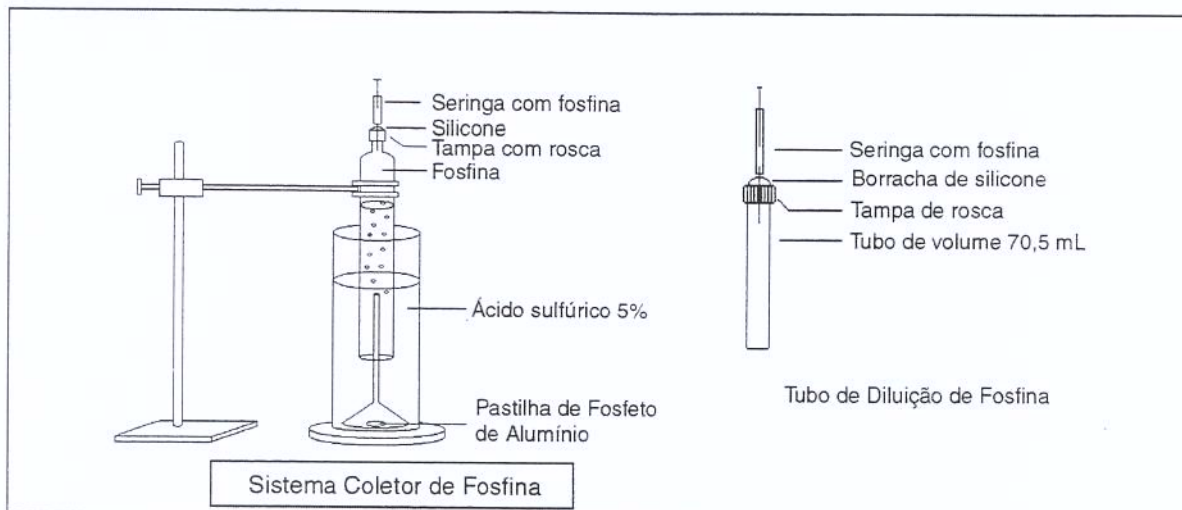


Figura 1. Sistema coletor de fosfina (SCF) e tubo de diluição de fosfina (TDF).

C. Curva-padrão de fosfina

Em tubos de vidro (1,0cm x 10cm) com orifícios nas tampas, fechados com silicone e septo de borracha, foram adicionados 8,0mL da solução de nitrato de prata (7,5mg/250mL de água). Com seringa *gastight* foram retiradas alíquotas do tubo TDF e injetadas nos tubos de vidro para obtenção de concentrações de fosfina na faixa de 0,01 μ g/mL e 0,09 μ g/mL. A fosfina com o nitrato de prata formaram o cromóforo de cor amarela, o qual foi determinado em espectrofotômetro a 400nm de comprimento de onda. Na preparação do branco, injetou-se ar na solução de nitrato de prata. Os valores da absorbância e as respectivas concentrações encontram-se na curva-padrão (Figura 2).

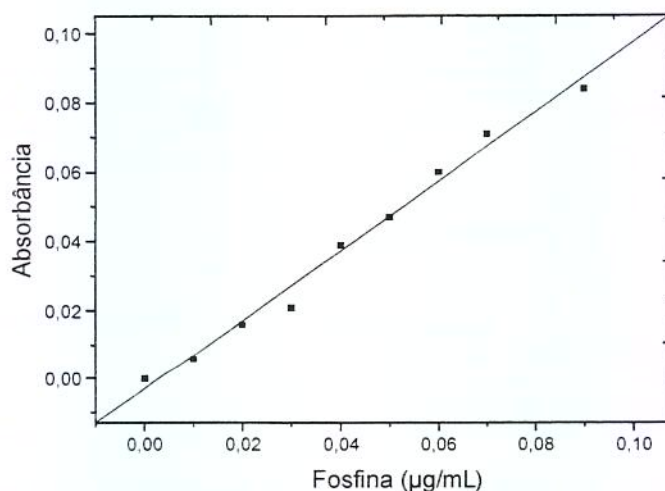


Figura 2. Curva padrão de fosfina

D. Determinação do resíduo de fosfina em milho

Para determinação de fosfina em milho foi utilizado o método de RANGASWAMY (1984), segundo o seguinte procedimento:

Em tubos de vidro de 2,0cm x 20cm foram pesadas 20g de milho triturado em processador. Adicionaram-se 60mL de solução de nitrato de prata (7,5mg/mL), agitando-se os tubos intercaladamente quatro vezes, durante 1 minuto. Após 45 minutos, os tubos foram centrifugados a 15.000rpm, entre 5°C e 10°C, durante 30 minutos em centrífuga marca Sorvall, modelo RC 26 plus, utilizando-se rotor SA300. Após centrifugação os extratos foram filtrados em filtros de 0,45µm. Preparou-se uma amostra testemunha sem fosfina que foi utilizada como branco. Foram lidas as absorbâncias dos extratos em espectrofotômetro, marca Phillips, modelo PU8620 UV/VIS/NIR na região do visível a 400nm. Para cálculo das concentrações de fosfina nas amostras foram comparadas as absorbâncias das amostras com as obtidas com os padrões.

Para determinação da recuperação foram utilizadas as mesmas quantidades e o mesmo procedimento anteriores, injetando-se fosfina no milho-testemunha correspondente a concentrações de 1,0µg/g e 0,5µg/g antes da

fortificação com fosfina para validação do método e antes da quantificação deste gás nos grãos submetidos à fumigação, as amostras foram homogeneizadas em homogeneizador rotatório, durante 45 minutos.

Embora os extratos tenham sido submetidos à centrifugação, visando separar as partículas, ocasionalmente foi necessário uma posterior microfiltração para proporcionar uma solução final cristalina.

E. Determinação dos níveis de sorção de fosfina em milho

Os níveis de sorção de fosfina foram obtidos pela diferença entre as concentrações inicialmente aplicadas e aquelas obtidas antes da abertura dos dessecadores, após o período de exposição ao fumigante. A concentração de fosfina foi obtida por cromatografia gasosa. Uma curva-padrão de fosfina (Figura 2) foi utilizada para se obter concentrações de acordo com as áreas integradas. As condições cromatográficas foram: cromatógrafo gasoso HP 6890 com um detector fotométrico de chama, temperatura de 150°C, com um filtro de fósforo (525 nm), fluxo de nitrogênio de 150mL/min e fluxo de ar de 110mL/min. coluna capilar 1909/j413 HP-5 com metil fenil siloxano 5% (30mx320µmx0,25µm) com um fluxo constante de nitrogênio de 2.0mL/min. e um injetor no modo split (50:1) com make up a 60mL/min, ambos a 150°C. O cromatógrafo foi conectado a um computador (Chemstation) HP Vectra XA, o qual integra picos de área e calcula concentrações. Uma amostra de 20mL foi injetada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Sorção de fosfina

Os resultados de sorção e de resíduo de fosfina, em função das variáveis estudadas, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Sorção e resíduos de fosfina nas amostras analisadas (média de 3 repetições).

Dose de fosfina ($\mu\text{g/g}$)	Tempo (dias)	Atividade de água	Resíduo de fosfina no milho ($\mu\text{g/g}$)	Sorção de fosfina (g m^{-3})
0,8	3,8	0,87	< 0,1	0,1
3,2	3,8	0,87	< 0,1	0,4
0,8	12,2	0,87	< 0,1	0,1
3,2	12,2	0,87	< 0,1	0,7
0,8	3,8	0,95	< 0,1	0,1
3,2	3,8	0,95	< 0,1	0,3
0,8	12,2	0,95	< 0,1	0,4
3,2	12,2	0,95	< 0,1	1,1
2,0	8	0,85	< 0,1	0,3
2,0	8	0,98	< 0,1	1,5
2,0	1	0,92	< 0,1	0,1
2,0	15	0,92	< 0,1	0,6
0,0	8	0,92	< 0,1	0,0
4,0	8	0,92	< 0,1	0,4
2,0	8	0,92	< 0,1	0,3
2,0	8	0,92	< 0,1	0,5
2,0	8	0,92	< 0,1	0,2
2,0	8	0,92	< 0,1	0,5
2,0	8	0,92	< 0,1	0,6
2,0	8	0,92	< 0,1	0,3

Os níveis de sorção variaram de 0,1 a $1,5\text{g m}^{-3}$. Não existem dados na literatura sobre sorção de fosfina nas condições do experimento. A fosfina, quando

liberada para atmosfera, é degradada muito vagarosamente devido á reação de oxidação com oxigênio do ar atmosférico.

A análise de regressão dos resultados da Tabela 2 possibilitou obter um modelo matemático para sorção de fosfina, em função das variáveis estudadas (Tabela 3) .

Tabela 3. Modelo matemático para sorção de fosfina.

Modelo Real ($p < 0,1$)	Coefficiente de determinação (R^2)
$Y = 102,20 - 30,20a_w + 128,91a_w + 20,039t + PH_3 * 0,374 - 0,06 * PH_3^2$	78,31%

Y= sorção de fosfina. a_w = atividade de água. PH_3 = concentração de fosfina ($g\ m^{-3}$)

T= tempo de exposição ao fumigante.

A análise de efeitos indicou que a atividade de água, o tempo de exposição e a concentração do fumigante influenciam os níveis de sorção. O aumento desses fatores correspondeu a maiores níveis de sorção do fumigante pelos grãos. A análise de variância pelo erro puro (Tabela 4) mostrou que, ao nível de confiança de 90%, o valor de F calculado da regressão foi maior que o valor tabelado e, portanto, o modelo obtido é válido.

Tabela 4: Análise de variância para sorção de fosfina

Fontes de variação	S.Q.	G.L.	M.Q.	F.calculado
Regressão	1,845521	5	0,369	8,2
Resíduos	0,631979	14	0,045	
Falta de ajuste	0,511979	9	0,0569	2,37
Erro puro	0,12	5	0,024	
Total	2,477500	19		

S.Q.:soma quadrática, G.L.:Graus de liberdade, M.Q.: Média quadrática; Fcalc.:Valor de F calculado

As atividades de água foram fixadas em 0,89, 0,92 e 0,95 (Figura 3), de modo a poder visualizar melhor o que ocorre com a sorção do fumigante com o

aumento da atividade de água. Verifica-se que com o aumento da atividade de água os níveis de sorção também aumentam. A 0,89 de atividade de água, os níveis de sorção máximos estimados alcançados foram superiores a $0,6\text{g m}^{-3}$, a 0,92 de atividade de água foram de $0,68\text{g m}^{-3}$ e a 0,95 de atividade de água foram superiores a $0,97\text{g m}^{-3}$.

3.2 Resíduos de fosfina em milho

Os resultados das adições e recuperações de fosfina em milho encontram-se na Tabela 5. A coloração amarela do milho, proveniente dos carotenóides, não provocou interferência nas análises quando da formação do cromóforo amarelo de nitrato de prata-fosfina. Isto porque pela utilização do milho sem fumigação como branco, durante a leitura da absorbância a 400nm, subtraiu-se o valor de absorbância oriunda da coloração amarela do milho, resultando em recuperações na faixa de 94% a 117%.

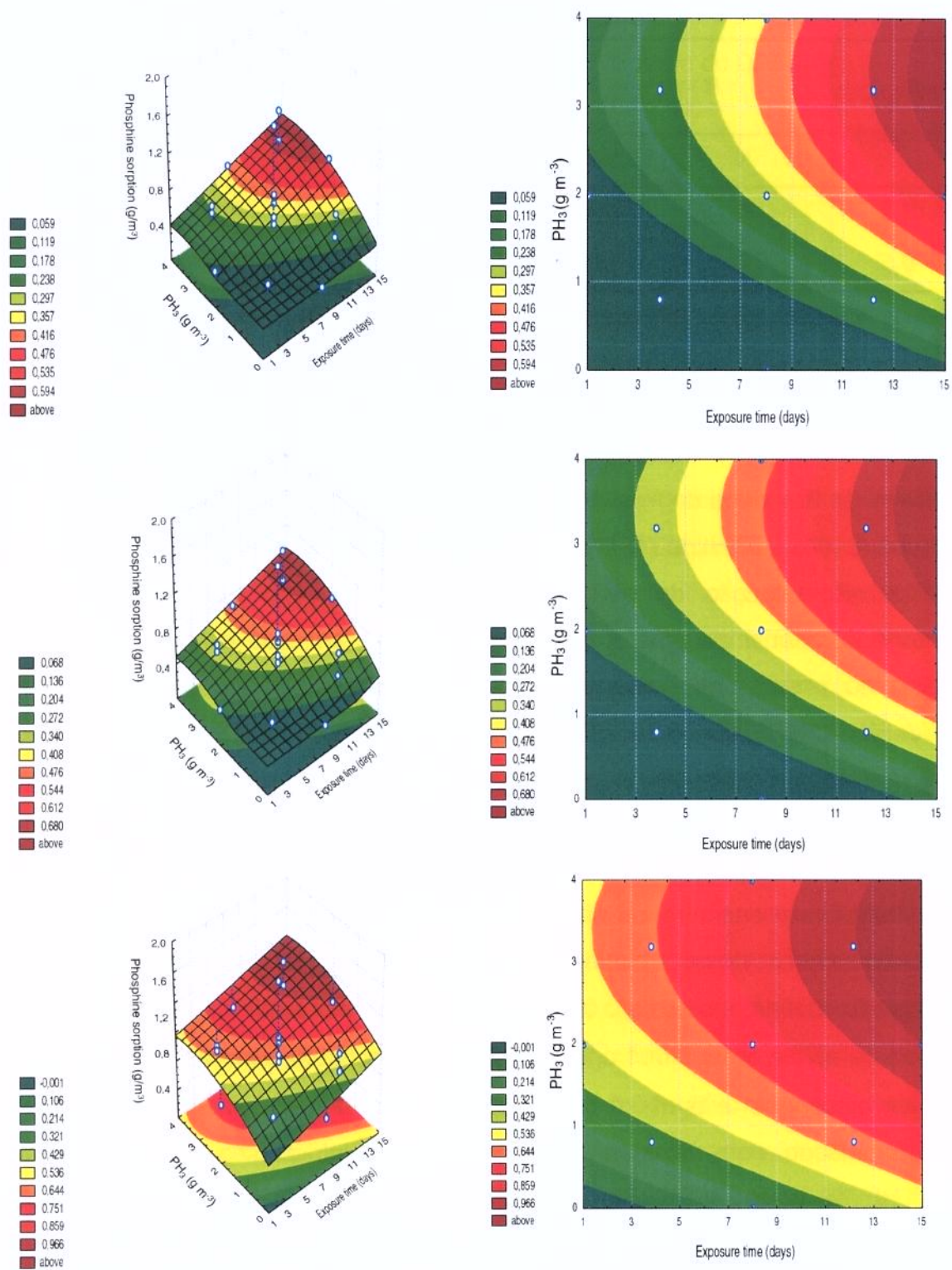


Figura 3. Superfícies de resposta para sorção de fosfina em função da concentração e tempo de exposição ao fumigante em milho em grãos com atividade de água fixada em 0,89; 0,92 e 0,95 (equivalente a conteúdos de umidade de 16,2%; 19,2% e 21,6%, b.u.)

Tabela 5. Adição e recuperação de fosfina em milho testemunha.

Fortificação (mg/kg)	Recuperação (%)		Estimativa do DPA (±)		CV (%)
	N	Faixa	Média		
1,0	4	(95 - 117)	108	11	10
0,5	4	(94 - 116)	110	10	9

n = número de determinações. DPA = Desvio Padrão Absoluto. CV=coeficiente de variação

Não foram detectados resíduos de fosfina nas amostras de milho fumigado dentro do limite de quantificação do método ($0,1\mu\text{g/g}$) (Tabela 5). A Legislação Brasileira de Resíduos de Pesticidas estabelece $0,1\mu\text{g/g}$ como o limite máximo de resíduos (LMRs) permitido para fosfina em grãos (BRASIL, 1985).

A não-deteção de resíduos de fosfina no milho provavelmente está relacionado, com a aeração a que as amostras foram submetidas logo após o término do período de fumigação. Estes resultados estão coerentes com os obtidos por DIETERICH *et al.* (1967) e AL-OMAR, AL-BASSOMY (1984). Vários experimentos realizados por estes autores demonstram que não foram detectados resíduos de fosfina, devido às amostras terem sido submetidas a aeração adequada.

Não foram encontrados na literatura resultados de pesquisas semelhantes às desenvolvidas neste trabalho. Entretanto, alguns autores reportam níveis residuais de fosfina abaixo de $0,01\mu\text{g/g}$ em grãos, como arroz e soja, coletados no comércio e níveis entre $0,001$ e $0,022\mu\text{g/g}$ em trigo fumigado com fosfina, após 3 anos de estocagem e também concentrações de $0,04\mu\text{g/mL}$ de fosfina em trigo, após fumigação com tabletes comerciais de phostoxin seguido de aeração. (MATTHEWS *et al.*, 1970, RAUSCHER *et al.*, 1972, BARRETO *et al.*, 1984). Esses valores estão bem abaixo do limite mínimo de detecção do método utilizado neste estudo e também daquele necessário para atender à legislação vigente.

Não foi possível obter uma superfície de resposta para o resíduo de fosfina, uma vez que não foram detectados resíduos desse fumigante nas condições estudadas no presente estudo.

4. CONCLUSÕES

- Foi possível expressar, por meio de um modelo matemático, o efeito da atividade de água, concentração de fosfina e tempo de exposição nos níveis de sorção de fosfina em milho com elevado teor de umidade sendo que o aumento desses fatores correspondeu a maiores níveis de sorção do fumigante pelos grãos.
- A concentração do fumigante, a atividade de água e o período de exposição afetaram significativamente os níveis de sorção obtidos.
- O uso da fosfina com a finalidade de controlar fungos em milho com elevado teor de umidade não apresenta impedimentos sob o ponto de vista de segurança alimentar visto não deixar resíduos no produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-OMAR, M.A.; AL-BASSOMY, M. Persistence of phosphine gas in fumigated Iraqi dates. **Journal of Food Safety**, **6** (4): 253-260, 1984.
- BARRETO, H.H.C.; INOMATA, O.N.K.; LARA, W.H. Determinação de fosfina em alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, **44**(2): 149-153, 1984.
- BERCK, B.; GUNTHER, F.A. Rapid determination of sorption affinity of phosphine by fumigation within a gas chromatographic column. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **18**(1):148-153, 1970.
- BERCK, B. Potentiometric determination of phosphine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **16** (3): 415-418, 1968.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n.º 10/85 de 8 de março de 1985. Diário Oficial da União 14 de março de 1985.
- BOX, G.E.P., HUNTER, W.G, HUNTER , J.S. Statistics for experimenters. An introduction to design data analysis and model building. New York, John Wiley, 1978.
- CASTRO, M.F.P.M. de; PACHECO, I.A. Utilization of the phosphine fumigant for the control of fungi naturally present in stored paddy rice (*Oryza sativa*, L.), **Revista de Microbiologia**, São Paulo, **26**(3): 230-235, 1995.
- CASTRO, M.F.P.M. de; PACHECO, I.A., TANIWAKI, M.H. Effects of phosphine on aflatoxin production in peanuts stored with a high content. In: **Methyl Bromide Technical Options Workshop**. Washington, USA, 1992.
- CASTRO, M.F.P.M. de, PACHECO, I.A.; SOARES, L.M.V.; FURLANI, R.P. Phosphine fumigation of stored peanuts for *A. flavus* (Link)/ *A. parasiticus* (Speare) and aflatoxins control. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, **26**(4):296-301, 1995.
- CASTRO, M.F.P.M. de; PACHECO, I.A., SOARES, L.M.V; FURLANI, R.P.; DE PAULA, D.C. BOLONHEZI, S. Warehouse control of *A. flavus*(Link)/ *A. parasiticus* (Speare) on peanuts (*Arachis hypogaea*, L.) by phosphine fumigation and its effects on aflatoxin production. **Journal of Food Protection**, **59** (4): 407-411, 1996.
- CASTRO, M.F.P.M. de; SOARES, L.M.V; FURLANI, R.P. Mycoflora, aflatoxigenic species and mycotoxins in freshly harvested corn (*Zea mays*, L.): a preliminary study. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, **26**(4): 289-295, 1995.
- CASTRO, M.F.P.M. de; LEITÃO, M.F.F.; OLIVEIRA, J.J.V.; ANICHIÁRICO, E.S.; YOTSUYANAGI, K.; MILLS, K.A. Effects of phosphine on the growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production in corn stored at different moisture

contents. In: **Proceedings of the International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation**, Fresno, USA, 2001.

DIETERICH, W.H.; MAYR, G.; HILD, K.; SULLIVAN, J.B.; MURPHY, J. Residues Reviews , 19, 135, 1967. Apud. RAUSCHER, H.; MAYR, G.E.; SULLIVAN, J.B. Sorption and recovery of phosphine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **20** (2): 331-333, 1972.

HOCKING, A.D., BANKS, H.J. Effects of phosphine fumigation on survival and growth of storage fungi in wheat. **Journal of Stored Product Research**, **41**(1): 232, 1991a, Oxford.

HOCKING, A.D., BANKS, H.J. Effects of phosphine fumigation on the development of storage mycoflora in paddy rice. In: **International Working Conference on Stored Product Protection**, 5, Bordeaux, France, 1991b, p. 823-831.

MATTHEWS, R.H.; FIFIELD, C.C.; HARTSING, T.F.; STOREY, C.L.; DENNIS, N.M. Affects of fumigation on wheat in storage. I. Physical measurements flour. **Cereal Chemists**, **47**: 579-586, 1970.

RANGASWAMY, J.R. Simple spectrophotometric method for determination of phosphine residues in wheat. **Journal of Association of Analytical Chemistry**, **67**(1): 117-122, 1984.

RAUSCHER, H.; MAYR, G.E.; SULLIVAN, J.B. Sorption and recovery of phosphine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **20** (2): 331-333, 1972.

SALEM, H.; M'NAOUAR, H. Adsorption de la phosphine par les dattes fumiguées. **Fruits**, **46** (5): 581-585, 1991.

ANEXOS

Tabela1: Equações de regressão e coeficientes de determinação obtidos para as curvas de adsorção e dessorção.

Equações de regressão	Coeficientes de determinação
$y = 263,43x^2 - 411x + 174,33$ (adsorção)	$r^2 = 0,9644$
$y = 210,49x^2 - 317,41x + 133,54$ (dessorção)	$r^2 = 0,9605$

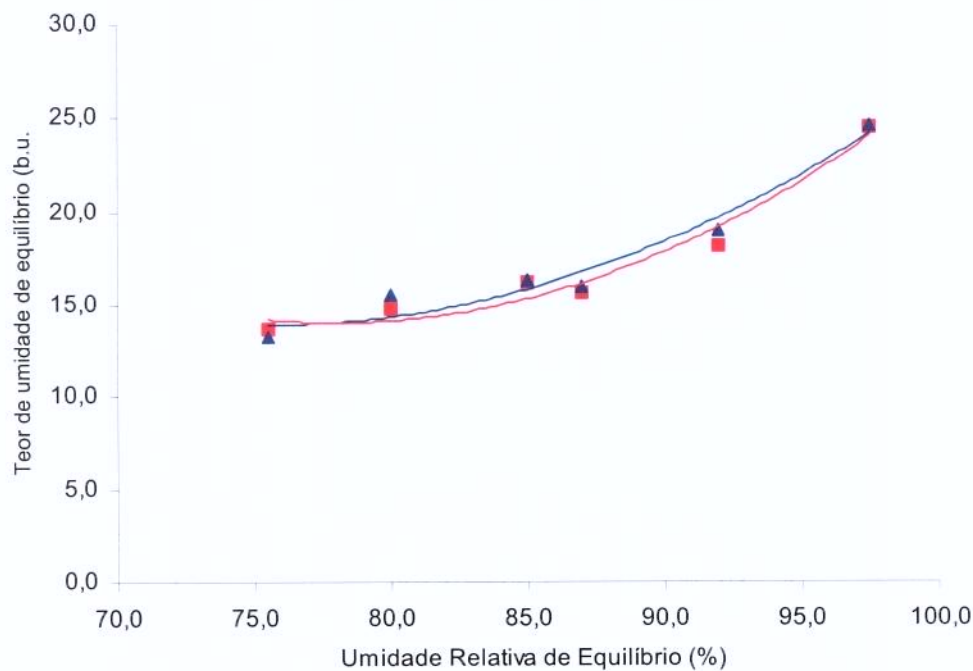


Figura 1. Curvas de adsorção (■) e dessorção (▲) de umidade para milho em grãos Cargill 606

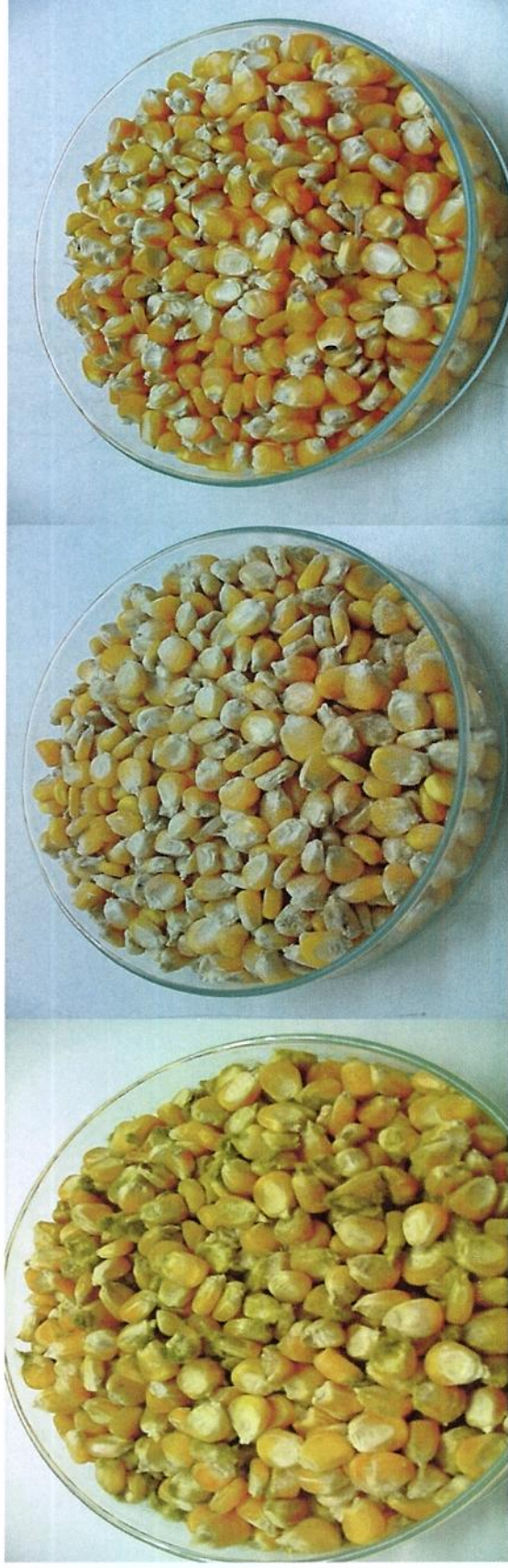


Figura 2. Milho em grãos, não fumigado com fosfina, com *Aspergillus flavus* crescendo na superfície (esquerda), com atividade de água superior a 0,92 apresentando crescimento de leveduras e bolores semelhantes à leveduras na superfície fumigado com fosfina (centro), milho com excelente aparência e brilho fumigado com fosfina nas condições adequadas (direita).

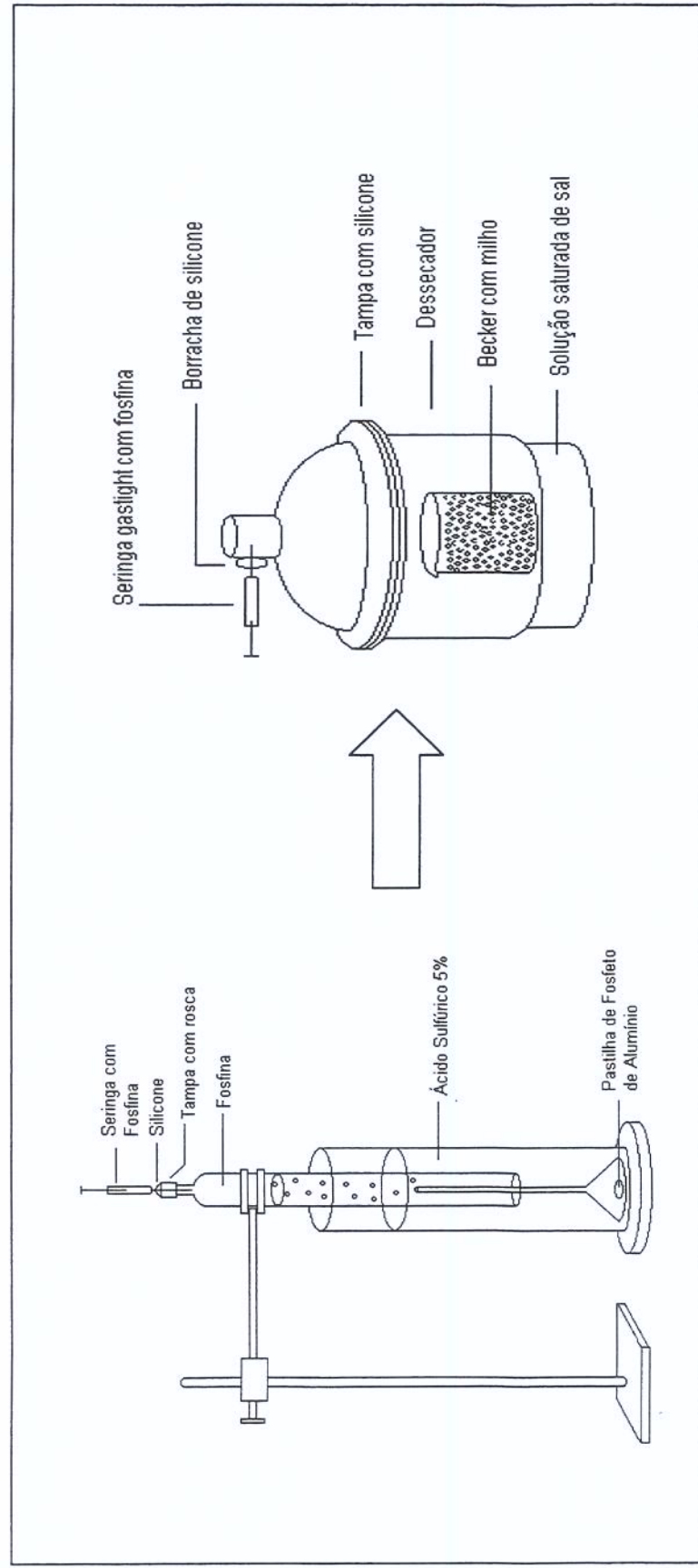


Figura 3. Esquema do experimento