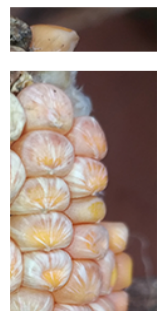




Variabilidade e Correlação nos Teores de Ácidos Fenólicos e de Fumonisinas em Grãos de Milho



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura e Pecuária**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
251**

**Variabilidade e Correlação nos Teores de Ácidos
Fenólicos e de Fumonisinias em Grãos de Milho**

*Valéria Aparecida Vieira Queiroz
Roberto dos Santos Trindade
Alexandre Gonçalves Teles
Flávio Dessaune Tardin*

**Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2023**

Embrapa Milho e Sorgo
Rod. MG 424, Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente
Maria Marta Pastina

Secretária-Executiva
Elena Charlotte Landau

Membros
*Cláudia Teixeira Guimarães, Mônica Matoso
Campanha, Roberto dos Santos Trindade,
Maria Cristina Dias Paes*

Revisão de texto
Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica
Rosângela Lacerda de Castro (CRB-6/2749)

Tratamento das ilustrações
Márcio Augusto Pereira do Nascimento

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Márcio Augusto Pereira do Nascimento

Foto da capa
Dagma Dionísia da Silva

1ª edição
Publicação digital (2023): PDF

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Milho e Sorgo

Variabilidade e correlação nos teores de ácidos fenólicos e de fumonisinas em
grãos de milho / Valéria Aparecida Vieira Queiroz ... [et al.]. – Sete Lagoas :
Embrapa Milho e Sorgo, 2023.

PDF (24 p.) : il. color. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa
Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 251).

1. *Zea mays*. 2. Micotoxina. 3. Contaminação. 4. Antioxidante. I. Queiroz,
Valéria Aparecida Vieira. II. Trindade, Roberto dos Santos. III. Teles, Alexandre
Gonçalves. IV. Tardin, Flávio Dessaune. V. Série.

CDD (21.ed.) 633.15

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução.....	8
Material e Métodos.....	10
Material.....	10
Análises Químicas.....	11
Ácidos fenólicos livres e ligados.....	11
Fumonisinias.....	13
Análises estatísticas.....	14
Resultados e Discussão	15
Conclusões.....	20
Referências.....	20

Variabilidade e Correlação nos Teores de Ácidos Fenólicos e de Fumonisinias em Grãos de Milho

Valéria Aparecida Vieira Queiroz¹

Roberto dos Santos Trindade ²

Alexandre Gonçalves Teles³

Flávio Dessaune Tardin ⁴

Resumo - As fumonisinias são as micotoxinas mais relevantes em milho cultivado no Brasil, por causa da alta prevalência e da elevada toxidez delas para animais e humanos. São sintetizadas por fungos do gênero *Fusarium*, predominantemente de campo, por isso, a melhor maneira de reduzir acúmulo delas nos grãos é prevenir a contaminação da cultura. Compostos naturais produzidos por plantas, como os fenólicos, têm sido relatados na literatura como sendo potenciais agentes fungitóxicos, antibacterianos e antiviróticos. Portanto, especula-se que genótipos com maior teor desses compostos possam apresentar menor contaminação por micotoxinas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar, em um painel contendo 25 híbridos de milho, o grau de contaminação com fumonisinias, o teor de ácidos fenólicos livres e ligados e verificar se há correlação entre essas duas variáveis. Observou-se que 100% das amostras estavam contaminadas com fumonisinias, variando entre 64,5 µg/kg e 6.528 µg/kg de amostra, sendo que três estavam acima do limite estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (5.000 µg/kg). Houve variabilidade nos teores de ácidos fenólicos entre os híbridos avaliados, com maior concentração nas frações ligadas. O ácido ferúlico foi o de maior prevalência, tanto nas frações livres quanto ligadas. Não foi verificada correlação entre os ácidos fenólicos analisados e os teores de fumonisinias B1 (FB1), fumonisinias B2 (FB2) e fumonisinias totais. No entanto, os híbridos 1Q2461 e 1R2631 se destacaram com baixos

¹ Nutricionista, doutora em Produção Vegetal, pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG

² Engenheiro-agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG

³ Estudante do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de São João del-Rei/CSL, Bolsista PIBIC do Convênio Fapemig/CNPq/Embrapa Milho e Sorgo/ Faped, Sete Lagoas, MG

⁴ Engenheiro-agrônomo, doutor em Produção Vegetal, pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG

níveis de contaminação com fumonisinas e com teores de ácidos fenólicos consideráveis, revelando potencial para uso em programas de melhoramento de milho visando à resistência à presença de *Fusarium* e, conseqüentemente, à produção dessa micotoxina.

Termos para indexação: micotoxinas, segurança alimentar, compostos fenólicos, resistência genética.

Variability and Correlation in the Contents of Phenolic Acids and Fumonisinins in Corn Grains

Abstract - Fumonisinins are the most relevant mycotoxins in maize cultivated in Brazil, due to their high prevalence and high toxicity to animals and humans. They are synthesized by fungi of the genus *Fusarium*, predominantly in the field, so the best way to reduce their accumulation in grains is to prevent contamination. Natural compounds produced by plants, such as phenolics, have been reported in the literature as being potential fungitoxic, antibacterial and antiviral agents. Therefore, it is speculated that genotypes with higher content of these compounds may present less contamination by mycotoxins. Thus, the objective of this work was to evaluate, in a panel containing 25 maize hybrids, the degree of contamination with fumonisinins, the content of free and bound phenolic acids, and to verify if there is a correlation between these two variables. It was observed that 100% of the samples were contaminated with fumonisinins, ranging between 64.5 µg/kg and 6,528 µg/kg of sample, and three of them were above the limit established by the Brazilian Health Regulatory Agency (Anvisa) (5,000 µg/kg). There was variability in the levels of phenolic acids among the evaluated hybrids, with a higher concentration in the bound fractions. Ferulic acid was the most prevalent, both in free and bound fractions. There was no correlation between the analyzed phenolic acids and B1, B2 and total fumonisin contents. However, the hybrids 1Q2461 and 1R2631 stood out with low levels of fumonisin contamination and considerable phenolic acid content, revealing potential for use in maize breeding programs aimed at resistance to the production of this mycotoxin.

Index terms: mycotoxins, food safety, phenolic compounds, genetic resistance, environmental sustainability.

Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é altamente suscetível ao ataque de uma variedade de fungos que infectam e colonizam as plantas no campo, causando perdas de produtividade, ou atacam os grãos na pós-colheita, reduzindo sua qualidade e segurança para consumo (Costa et al., 2018). Entre esses, o gênero *Fusarium* se destaca, por sua alta prevalência em sementes e em grãos de milho em todo o território brasileiro e por causar inúmeros danos em plântulas e podridão da raiz, do colmo e da espiga (Giordano et al., 2017), além de ser responsável por produzir micotoxinas altamente tóxicas nos grãos, como fumonisinas e fusarinas, (*Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum*) e desoxinivalenol (DON) e zearalenona (*F. graminearum*) (Pasquali et al., 2016).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos, prejudiciais à saúde dos seres humanos e dos animais (Mycotoxins..., 2003; Omotayo et al., 2019). São estáveis ao calor, por isso, não podem ser totalmente eliminadas durante os processos usualmente utilizados na produção de alimentos e de rações (Hazel; Patel, 2004), tornando-se um problema de importância mundial (Omotayo et al., 2019). Por causa da elevada incidência, dos níveis de contaminação nos grãos e da alta toxidez, as fumonisinas são as micotoxinas mais relevantes em milho (Lanza et al., 2016).

Como as fumonisinas são produzidas por *Fusarium*, que é um fungo predominantemente de campo, a melhor maneira de reduzir seu acúmulo nos grãos é a prevenção da contaminação. Porém, são vários os fatores que contribuem para o desenvolvimento fúngico e a produção de micotoxinas, como condições ambientais, práticas agrícolas e suscetibilidade do genótipo. Assim, diversas devem ser, também, as estratégias utilizadas para mitigação do problema. Nesse sentido, vem crescendo o interesse por tecnologias mais naturais e sustentáveis, a exemplo da busca por fontes genéticas de resistência a doenças fúngicas e de seus mecanismos de ação (Giordano et al., 2017). Compostos naturais produzidos por plantas, como os fenólicos, têm sido relatados na literatura como sendo potenciais agentes fungitóxicos, antibacterianos e antiviróticos (Scorzoni et al., 2016). Portanto, especula-se que genótipos com maior teor desses compostos possam apresentar correlação com menor contaminação por micotoxinas.

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários naturais biossintetizados nas plantas por meio de vias metabólicas, como pentose fosfato, chiquimato e via fenilpropanoide (Cheynier et al., 2013; Heleno et al., 2015). Essas vias são usadas pelas plantas para produzir compostos fenólicos monoméricos, como flavonoides, ácidos fenólicos e fenilpropanoides, ou compostos fenólicos poliméricos, como taninos, ligninas, lignanas e melaninas. Esses compostos possuem diversidade estrutural por causa da sua função específica no crescimento e no mecanismo de defesa da planta. Eles não apenas ajudam na regulação de vários tipos de funções fisiológicas nas plantas durante o crescimento e desenvolvimento, mas também estão envolvidos nos mecanismos de defesa das plantas contra condições de estresse, tanto abiótico quanto biótico (Chowdhary et al., 2022). A capacidade de sintetizar compostos fenólicos específicos em resposta ao estresse biótico ou abiótico é desenvolvida nas plantas por meio de fenômenos evolutivos adaptativos. Em razão de diferentes desafios ambientais, as plantas desenvolveram diversidade na síntese de vários compostos fenólicos (Caputi et al., 2012).

No caso do estresse biótico, as plantas acumulam fenóis nos locais de infecção para retardar o crescimento de patógenos microbianos e restringi-los ao local infectado (Chowdhary et al., 2022). Estudos têm sugerido que os compostos fenólicos eliminam patógenos fúngicos por alterações causadas na permeabilidade da membrana celular e na integridade da parede celular, por supressão da atividade das enzimas, por formação de radicais livres, por inibição da biossíntese de certas proteínas, por danos ao DNA e por supressão da expressão de genes de virulência.

Nos grãos de milho, os ácidos fenólicos (AF) nas formas solúveis (livres) ou ligados à parede celular (conjugados) representam a forma mais comum de compostos fenólicos. Em ensaio *in vitro*, esses AF foram capazes de reduzir o crescimento fúngico e o acúmulo de micotoxinas. Portanto, eles poderiam desempenhar um papel na inibição de espécies micotoxigênicas de *Fusarium* (Boutigny et al., 2009). Um estudo relatado por Chiremba et al. (2012) mostrou alta correlação entre o teor de ácidos fenólicos e a dureza do endosperma de milho, a qual é altamente correlacionada, também, com o ataque de fungos e de pragas. Assim, é possível que o tipo e o teor de ácidos fenólicos presentes nos grãos de milho possam ter influência na dureza do

endosperma e, conseqüentemente, no grau de contaminação dos grãos com fungos e micotoxinas.

Um trabalho de Atanasova-Penichon et al. (2012) mostrou que, na fase inicial do desenvolvimento do grão de dois híbridos de milho amarelo, o ácido clorogênico pode ter desempenhado um papel na resistência do milho ao acúmulo de deoxinivalenol (DON). Já Picot et al. (2013) sugeriram um possível papel do ácido ferúlico ligado à parede celular na resistência do milho a *F. verticillioides*.

Entretanto, poucas informações estão disponíveis sobre o teor de ácidos fenólicos e a redução na produção de fumonisinas em grãos de milho, especialmente cultivados em condições climáticas brasileiras, e sobre correlação entre essas duas características, sendo esses os objetivos desse estudo.

Híbridos de milho que apresentem maior resistência ao ataque de fungos toxigênicos, como o *Fusarium*, poderão contribuir com a redução do número de aplicações de fungicidas nas lavouras e, conseqüentemente, com a menor contaminação dos grãos e do ambiente com esses agroquímicos. Nesse contexto, este trabalho atende à meta 12.4 estabelecida pela Organização das Nações Unidas (ONU): “Até 2020, alcançar o manejo ambientalmente saudável dos produtos químicos e todos os resíduos, ao longo de todo o ciclo de vida destes, de acordo com os marcos internacionais acordados, e reduzir significativamente a liberação destes para o ar, água e solo, para minimizar seus impactos negativos sobre a saúde humana e o meio ambiente”, relacionada ao Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 12: “Assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis”.

Material e Métodos

Material

Foram avaliados 25 híbridos de milho de um ensaio de valor de cultivo e uso (VCU) do programa de Melhoramento de Milho da Embrapa Milho e Sorgo. A semeadura aconteceu nas áreas experimentais da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG, com implantação do ensaio em dezembro de

2021 e colheita em junho de 2022. Foram avaliados 25 híbridos, em duas repetições de campo e parcelas de duas linhas de 4,2 m. Todos os tratos culturais utilizados nos experimentos seguiram as recomendações para a cultura do milho. A colheita de cada parcela foi feita com colheitadeira de parcelas, com aferição de peso e umidade na mesma ocasião, e retirada de uma amostra homogeneizada de 500 g de cada parcela para análise.

Os grãos foram enviados para o Laboratório de Segurança Alimentar da Embrapa Milho e Sorgo e acondicionados a -18 °C até as análises de fumonisinias e de ácidos fenólicos. Para as análises, os grãos foram moídos até granulometria 0,5 mm e utilizados conforme metodologias a seguir.

Análises Químicas

Ácidos fenólicos livres e ligados

A extração dos compostos fenólicos foi realizada com a solução extratora de metanol:água (80:20, v/v). Aproximadamente 0,2 g da amostra moída foi adicionada em 4 mL da solução extratora e levada para agitação em mesa agitadora (marca Nova Ética, modelo 109) a 200 rpm por 2 horas. Em seguida, a mistura foi centrifugada em centrífuga Jouan (modelo B4i) a 3.000 rpm durante 10 min, o sobrenadante foi coletado em cubeta, levado para secagem a 50 °C sob fluxo de ar comprimido seco e, posteriormente, foi ressuspensionado em 500 µL de solução de metanol:água (1:1, v/v). Em seguida, a amostra foi filtrada em filtro seringa de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com 0,22 µm.

Para a liberação dos ácidos fenólicos ligados às paredes celulares dos grãos de milho, foi realizada uma hidrólise básica no precipitado resultante da centrifugação. A ele, foram adicionados 4 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH 2M), e foi levado para homogeneização em agitador magnético (marca IKA, C-MAG HS 7) por 2 horas. Ajustou-se o pH, adicionando-se 0,8 mL de ácido clorídrico (PA). O conteúdo foi lavado com 20 mL de acetato de etila e, posteriormente, foi centrifugado a 3.000 rpm por 2 min. Esse procedimento foi realizado duas outras vezes. O sobrenadante das lavagens foi levado para secagem em rotaevaporador (marca IKA, RV 10 basic) a 50 °C. Posteriormente, a amostra foi ressuspensionada em 4 mL de solução de

metanol:água (1:1, v/v) e, após isso, foi filtrada em filtro seringa (PVDF) de 0,22 μm .

Para quantificação do perfil de ácidos fenólicos nos extratos, foi utilizado o cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) Waters Alliance™ 2695, utilizando-se uma coluna de fase reversa C18 de 250 mm x 4,6 mm, com partículas de 5 μm e um detector de matriz de diodo (DAD) de 320 nm. A eluição foi realizada com fase móvel em gradiente, de solução aquosa de ácido acético (99:1, v/v) e acetonitrila, com vazão de 1,0 mL/min, perfazendo um tempo total de 60 min. A identificação foi possível por meio da comparação com o tempo de retenção e do espectro de absorção dos padrões analíticos. Já a quantificação foi feita utilizando-se uma curva analítica com os padrões de solução de ácido ferúlico, cafeico e cumárico.

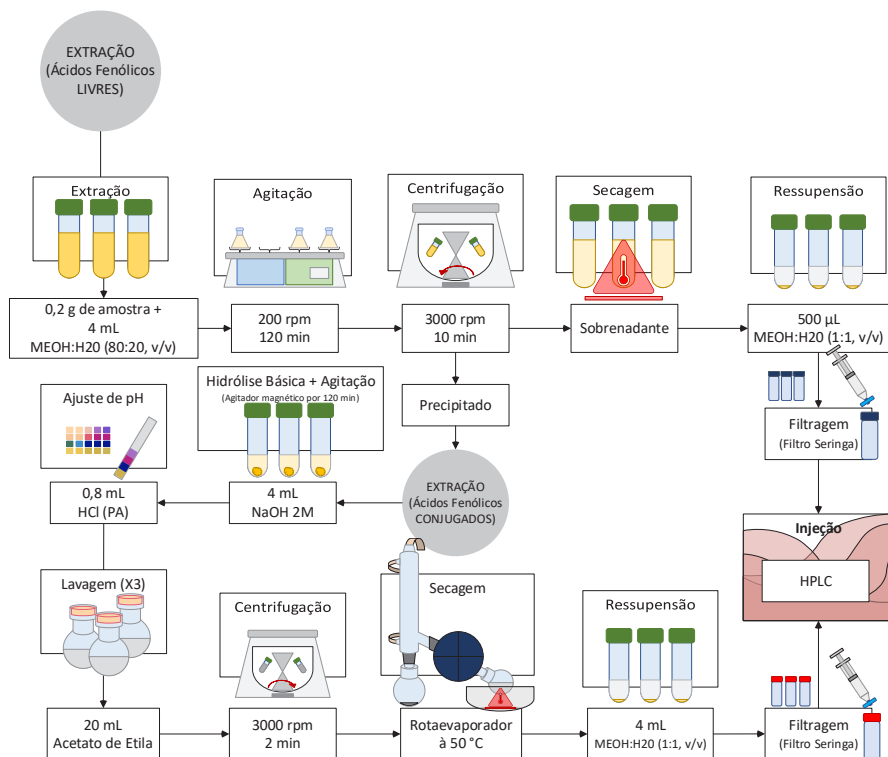


Figura 1. Desenho esquemático da extração e análise dos ácidos fenólicos livres e ligados.

Fumonisinias

Na análise dos teores de fumonisina B1 (FB1) e fumonisina B2 (FB2) e fumonisinias totais, 10 g de amostra moída foram extraídos com 50 mL de solução de extração água:metanol:acetonitrila (50:25:25 v/v), e levados para agitação a 200 rpm por 40 min. Logo após isso, os extratos foram centrifugados a 3.000 rpm por 10 min, e 5 mL do sobrenadante foram retirados e diluídos em 20 mL de solução PBS (tampão fosfato). A solução foi filtrada em filtro de microfibras de vidro e, em seguida, 10 mL foram transferidos para coluna de imunoafinidade Fumonitest. A coluna foi lavada com 10 mL de solução tampão PBS e, em seguida, 2,5 mL de metanol (grau HPLC) foram eluídos pela coluna. As amostras foram coletadas e levadas para secagem a 50 °C sob fluxo de ar comprimido seco e, posteriormente, ressuspendidas em solução acetonitrila:água (1:1, v/v). A uma alíquota de 50 µL dessa última solução, adicionaram-se 50 µL da solução de O-ftaldialdeído com 2-mercaptoetanol (OPA).

A quantificação dos teores de fumonisina foi realizada injetando-se a amostra em HPLC, acoplado com uma coluna de fase reversa C18 de 150 mm x 4,6 mm com 5 µm e detector de fluorescência (FLR) com 335 nm excitação e 440 nm emissão. A eluição foi realizada com fase móvel em gradiente de solução de MEOH:NaH₂PO₄ 0,1M (77:23, v/v), com vazão de 1,0 mL/min. O tempo de retenção foi de 4 min e de 9 min para FB1 e FB2, respectivamente. A quantificação dos teores foi realizada utilizando-se uma curva analítica com referência de fumonisinias, marca Trilogy Analytical Laboratory, com teor de fumonisinias totais de 4,3 mg/kg

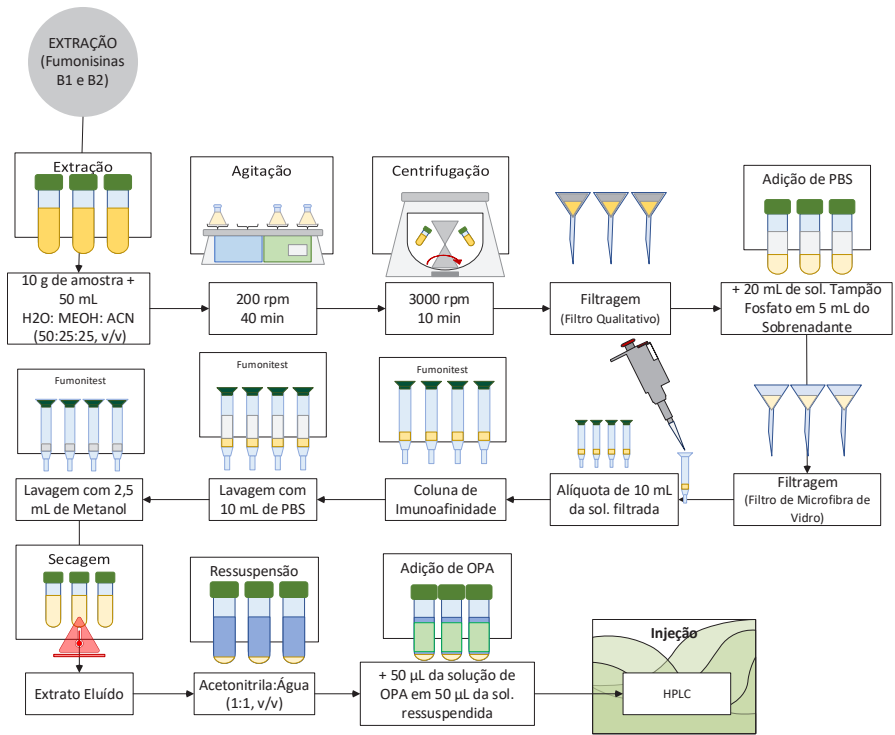


Figura 2. Desenho esquemático da extração e análise dos teores de fumonisina B1 e B2.

Análises estatísticas

O delineamento experimental foi em blocos casualizados (DBC), com duas repetições. Os resultados dos teores de ácidos fenólicos e de fumonisinas foram analisados por ANOVA, e as médias dos tratamentos (híbridos de milho) foram comparadas por teste de Tukey em nível de 5% de significância, utilizando-se o programa estatístico SISVAR. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar o nível de associação entre as variáveis: teores de ácidos fenólicos e teores de fumonisinas nos grãos de milho.

Resultados e Discussão

Neste estudo, identificaram-se e quantificaram-se os teores de compostos fenólicos e de fumonisinias B1 e B2 e total em 25 amostras de grãos de milho.

A Tabela 1 apresenta os teores dos ácidos fenólicos cafeico, cumárico e ferúlico, tanto nas frações livres como nas conjugadas das amostras analisadas.

Tabela 1. Teores dos ácidos fenólicos cafeico, cumárico, ferúlico livres e/ou conjugados ($\mu\text{g/g}$)* em grãos de milho de 25 híbridos cultivados em Sete Lagoas, MG, safra 2019/2020.

Genótipo	ACa liv		ACu liv		AFe liv		Total liv		ACu lig		AFe lig		Total lig	
	$\mu\text{g/g}$ (peso seco)													
1F640PRO2	5,7	ab	20,3	ab	13,5	a	39,4	ab	126,6	ab	2.121,1	ab	2.247,7	ab
1P2215	13,6	ab	14,9	ab	18,4	a	46,9	ab	153,7	ab	1.551,5	b	1.705,2	b
1Q2359	8,7	ab	9,2	b	9,3	a	27,2	b	110,1	ab	1.582,0	b	1.692,1	b
1Q2363	8,0	ab	14,6	ab	17,7	a	40,3	ab	177,2	ab	2.140,5	ab	2.317,7	ab
1Q2366	11,6	ab	17,0	ab	12,6	a	41,2	ab	95,4	ab	1.385,4	b	1.480,8	b
1Q2370	10,6	ab	13,7	ab	15,7	a	40,0	ab	175,4	ab	1.536,2	b	1.711,6	b
1Q2400	2,7	b	11,7	ab	18,1	a	32,4	ab	181,3	ab	1.996,3	ab	2.177,6	ab
1Q2423	11,2	ab	12,9	ab	10,1	a	34,2	ab	158,9	ab	1.589,1	b	1.748,0	b
1Q2425	10,1	ab	16,1	ab	14,9	a	41,1	ab	169,5	ab	1.530,7	b	1.700,2	b
1Q2427	9,1	ab	13,1	ab	13,8	a	36,0	ab	148,8	ab	2.064,1	ab	2.212,9	ab
1Q2461	12,4	ab	20,7	a	33,2	a	66,3	a	186,4	ab	1.852,6	ab	2.039,0	ab
1R2526	6,7	ab	11,5	ab	17,3	a	35,5	ab	176,1	ab	1.923,6	ab	2.099,7	ab
1R2529	7,4	ab	13,2	ab	10,4	a	31,0	ab	200,2	ab	2.136,9	ab	2.337,1	ab
1R2536	14,3	ab	12,5	ab	11,7	a	38,4	ab	117,1	ab	1.395,1	b	1.512,2	b
1R2539	8,7	ab	10,4	ab	10,5	a	29,5	ab	146,2	ab	1.830,1	ab	1.976,3	ab
1R2540	15,4	a	17,1	ab	18,8	a	51,3	ab	186,1	ab	1.893,9	ab	2.080,0	ab
1R2546	6,3	ab	12,1	ab	17,4	a	35,8	ab	131,0	ab	1.766,8	ab	1.897,8	ab

Tabela 1: Continua....

Genótipo	ACa liv		ACu liv		AFe liv		Total liv		ACu lig		AFe lig		Total lig	
	µg/g (peso seco)													
1R2622	8,9	ab	13,1	ab	16,5	a	38,5	ab	171,3	ab	1.598,6	b	1.769,9	b
1R2628	4,9	ab	11,4	ab	10,6	a	26,9	b	81,2	b	1.994,9	ab	2.076,1	ab
1R2629	8,6	ab	10,8	ab	9,3	a	28,8	b	172,6	ab	2.031,4	ab	2.204,0	ab
1R2631	3,6	b	9,6	ab	10,3	a	23,5	b	183,5	ab	2.690,7	a	2.874,2	a
2R2642	7,7	ab	16,1	ab	10,2	a	33,9	ab	145,6	ab	1.533,3	b	1.678,9	b
3R2593	7,9	ab	15,8	ab	22,5	a	46,2	ab	224,2	ab	1.945,3	ab	2.169,5	ab
AG8088PRO2	3,1	b	9,2	b	19,5	a	31,7	ab	186,8	ab	1.938,4	ab	2.125,2	ab
Mín.	2,7		9,2		9,3		23,5		81,2		1.385,4		1.480,8	
Média	8,8		13,6		14,9		37,3		161,9		1.832,4		1.994,3	
Máx.	15,4		20,7		33,2		66,3		242,8		2.690,7		2.874,2	

*Médias de duas repetições de campo. Aca liv: ácido cafeico livre. ACu liv: ácido cumárico livre. AFe liv: ácido ferúlico livre. ACu lig: ácido cumárico ligado. AFe lig: ácido ferúlico ligado. Médias seguidas de letras diferentes dentro da mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (P<0,05).

O total de ácidos fenólicos livres, que é o resultado do somatório dos ácidos fenólicos da fração livre, variou de 23,51 µg/g (híbrido 1R2631) a 66,3 µg/g (híbrido 1Q2461). Giordano et al. (2017) analisaram os níveis de fenólicos livres nos grãos de milho em diferentes estágios de desenvolvimento, e os resultados apresentaram teores muito acima dos encontrados neste estudo, com variações de 251,3 µg/g a 6.499,4 µg/g.

Os níveis de ácidos fenólicos na fração livre variaram de 2,72 µg/g (1Q2400) a 15,4 µg/g (1R2540) para o ácido cafeico. Quanto ao ácido cumárico, suas concentrações foram de 9,18 µg/g (AG8088PRO2) a 20,65 µg/g (1Q2461). Já para o ácido ferúlico livre, seus teores variaram de 9,27 µg/g até 33,21 µg/g. Todos os 25 genótipos foram estatisticamente semelhantes (P<0,05).

Na fração conjugada, não foi detectado ácido cafeico em nenhum dos híbridos analisados, e os teores dos ácidos cumárico e ferúlico e total foram muito superiores nessa fração em comparação com a livre. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos anteriores (Xu et al., 2010; Giordano et al., 2017). O híbrido 1R2620 apresentou a maior concentração

do ácido cumárico ligado (242,8 µg/g) e 1R2628 menor concentração (81,20 µg/g). O híbrido 1R2631 destacou-se com maior concentração de AFe lig (2.690,7 µg/g) e de ácidos fenólicos totais. Em geral, o ácido ferúlico foi o fenólico de maior incidência; ele é amplamente citado como um dos principais compostos fenólicos encontrados no milho (Holguín-Acuña et al., 2008). Os resultados obtidos neste estudo foram análogos aos encontrados por Atanasova-Penichon et al. (2012), que avaliaram as concentrações médias dos principais compostos fenólicos ligados à parede celular no milho, e identificaram o ácido ferúlico como sendo o principal fenólico ligado à parede celular nos grãos, entre 75% e 95% do conteúdo total de fenólicos conjugados.

A Tabela 2 mostra os resultados dos níveis de fumonisinias B1 e B2 e totais para os 25 genótipos de milho analisados. Os resultados mostram contaminação em 100% das amostras quanto às fumonisinias totais (FB1 + FB2). Observa-se que três amostras (12%) estavam acima do limite de 5.000 µg/kg estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para milho não processado (Brasil, 2022). A maior concentração foi expressa no híbrido 1Q2425 (6.528 µg/kg). Já para farinha de milho ou fubá, o limite estabelecido é de 1.500 µg/kg. Com isso, 13 amostras (52%) se encontravam dentro desse limite e 12 acima dele. As menores concentrações foram observadas nos híbridos 1Q2461, 1R2631, 1R2540 e 1R2536 (Tabela 2).

Tabela 2. Teores de fumonisinias B1, B2 e totais (µg/kg)* em grãos de milho de 25 híbridos cultivados em Sete Lagoas, MG, safra 2019/2020.

Genótipo	Fumonissina B1	Fumonissina B2	Fumonisinias totais
	µg/kg		
1Q2425	4.381,0 ab	2.147,0 a	6.528,0
1R2539	4.174,0 ab	2.116,5 a	6.291,0 ab
2R2642	4.434,5 a	1.601,0 ab	6.035,5 abc
1Q2427	3.590,5 ab	1.395,5 abc	4.986,0 abcd
1Q2370	3.064,0 ab	1.185,5 abc	4.249,0 abcd
1R2529	2.766,0 ab	900,0 abc	3.666,0 abcd
1R2628	2.490,5 ab	1.079,5 abc	3.569,5 abcd
1Q2423	2.353,0 ab	873,5 abc	3.226,5 abcd
1R2546	1.873,5 ab	595,0 abc	2.468,5 abcd
1Q2366	1.592,0 ab	640,0 abc	2.232,5 abcd
3R2593	1.311,5 ab	397,0 bc	1.708,5 abcd
1Q2400	1.247,5 ab	371,5 bc	1.619,0 abcd
1P2215	880,5 ab	320,0 bc	1.200,5 abcd

Tabela 2: Continua...

Genótipo	Fumonisina B1	Fumonisina B2	Fumonisinias totais
	µg/kg		
1R2622	643,5 ab	224,5 bc	868,5 abcd
1R2526	509,0 ab	79,5 bc	588,5 bcd
AG8088PRO2	297,0 ab	114,0 bc	411,0 cd
1R2629	238,5 ab	150,0 bc	388,5 cd
1Q2359	244,0 ab	73,5 bc	317,5 cd
1Q2363	205,5 ab	45,0 bc	250,5 cd
1R2536	163,5 ab	25,5 bc	189,0 d
1R2540	171,0 ab	18,0 bc	189,0 d
1R2631	73,5 b	0,0 c	73,5 d
1Q2461	64,5 b	0,0 c	64,5 d
Mínimo	64,5	0,0	64,5
Média	1.513,5	586,4	2.100,0
Máximo	4.434,5	2.147,0	6.528,0

*Médias de duas repetições de campo. Médias seguidas de letras diferentes dentro da mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (P<0,05).

A fumonisina é um tipo de micotoxina produzida por fungos do gênero *Fusarium*, podendo contaminar os grãos durante o armazenamento e antes dele, isto é, ainda no campo. Em estudos, Queiroz et al. (2012) avaliaram a ocorrência de fumonisinias em milho armazenado em fazenda familiar em Minas Gerais, Brasil, e encontraram valores que variaram de 230 µg/g a 6.450 µg/kg, corroborando com os resultados deste estudo quanto à incidência e aos valores encontrados (64,5 µg/g a 6.528,0 µg/kg). Camargos et al. (2000) analisaram o teor de fumonisinias em 19 cultivares de milho em três bases experimentais do Instituto Agrônomo, em São Paulo, Brasil. Os níveis de micotoxina variaram de 1.63 µg/g a 25.69 µg/g, resultado muito acima dos teores encontrados no presente trabalho. Essas diferenças podem ter ocorrido pela diversidade genética dos materiais utilizados em ambos os estudos, e por condições de clima e cultivo distintas. O alto acúmulo de fumonisinias nos grãos de milho, possivelmente, ocorre em razão das condições propícias, destacando-se, principalmente, as altas temperaturas e a intensa pluviosidade. Portanto, maiores registros são observados durante a safra de verão (Mac Jr.; Soares 2000; Henig et al., 2020). Além disso, segundo Henig et al. (2020), elevadas variações no teor de micotoxinas estão associadas a fatores como solo, fertilização, práticas culturais, pragas e até mesmo a própria cultivar.

Para a concentração de fumonisina B1 (FB1), os teores variaram de 64,5 µg/g a 4.434,5 µg/kg, sendo o menor teor, assim como nas fumonisinias totais, expresso pelo genótipo 1Q2461. A FB1 foi a micotoxina de maior presença registrada, corroborando com o que foi relatado por Kawashima e Soares (2006), que avaliaram 74 amostras de produtos de milho, sendo 71 (96%) positivas para fumonisina B1.

Já em relação à fumonisina B2 (FB2), 92% dos genótipos apresentaram contaminação. Orsi et. al (2000) relataram uma porcentagem um pouco acima da apresentada neste estudo em relação à fumonisina B2. Eles estudaram a ocorrência de fumonisina em milhos recém-colhidos e após armazenamento em instalações normais no estado de São Paulo, Brasil, e obtiveram resultados positivos para FB2, acima de 97% das 195 amostras testadas. As cultivares 1Q2461 e 1R2631 apresentaram resultado negativo para FB2. Por outro lado, o genótipo 1Q2425 apresentou maior concentração dessa micotoxina, por volta de 2.147,0 µg/kg.

Tabela 3. Coeficientes de correlações simples de Pearson entre as variáveis: teores de ácido fenólicos e fumonisinias B1, B2 e totais, em grãos de milho.

	Fumonisinia B1	Fumonisinia B2	Fumonisinias totais
ACa liv	-0,038	-0,015	-0,031
ACu liv	0,019	0,001	0,014
AFe liv	-0,312	-0,311	-0,313
Total liv	-0,195	-0,192	-0,195
ACu lig	-0,163	-0,196	-0,174
AFe lig	-0,261	-0,261	-0,262
Total lig	-0,269	-0,273	-0,271

ACa liv: ácido cafeico livre. ACu liv: ácido cumárico livre. AFe liv: ácido ferúlico livre. ACu lig: ácido cumárico ligado. AFe lig: ácido ferúlico ligado.

As correlações entre os ácidos fenólicos livres e conjugados e os teores de fumonisinias B1, B2 e totais foram descritas na Tabela 3. Os valores das correlações variaram de -0,0313 a 0,001, estes valores mostram que não houve correlação entre essas variáveis analisadas, ou seja, elevados teores

de ácidos fenólicos não influenciam diretamente na diminuição da produção das micotoxinas FB1 e FB2.

Conclusões

Os níveis de fumonisinas totais revelaram contaminação em 100% dos 25 híbridos de milho, com variações consideráveis para fumonisinas B1 e B2. A porcentagem de amostras acima do limite estabelecido pela Anvisa foi de 12%, fato que representa uma preocupação em relação à segurança alimentar. Os híbridos 1Q2461, 1R2631, 1R2540 e 1R2536 apresentaram baixas incidências de micotoxina. A avaliação dos teores de ácidos fenólicos mostrou variações estatisticamente significativas tanto nas frações livres quanto nas conjugadas. O ácido ferúlico teve a maior incidência em ambas as frações, evidenciando-se como um dos principais do milho. Os híbridos 1Q2461 e 1R2631 foram superiores, em relação aos teores de ácidos fenólicos totais livres e conjugados, respectivamente. Não foi verificada correlação entre os teores de ácidos fenólicos analisados e os teores de fumonisinas B1, B2 e total. Portanto, maiores teores de ácidos fenólicos não têm efeito na redução da produção de fumonisinas pelo fungo. Todavia, os híbridos 1Q2461 e 1R2631 se destacaram com baixos níveis de contaminação com fumonisinas e com teores de ácidos fenólicos consideráveis. Assim, sugerem-se novas avaliações desses híbridos em outras safras e locais de cultivo para confirmar seu potencial de resistência à produção de fumonisinas, que certamente poderá trazer benefícios econômicos e para a saúde de animais e humanos.

Referências

ATANASOVA-PENICHON, V.; PONS, S.; PINSON-GADAIS, L.; PICOT, A.; MARCHEGAY, G.; BONNIN-VERDAL, M.-N.; DUCOS, C.; BARREAU, C.; ROUCOLLE, J.; SEHABIAGUE, P.; CAROLO, P.; RICHARD-FORGET, F. Chlorogenic acid and maize ear rot resistance: a dynamic study investigating *Fusarium graminearum* development, deoxynivalenol production, and phenolic acid accumulation. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v 25, n. 12, p. 1605-1616, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1094/mpmi-06-12-0153-r>.

BOUTIGNY, A.-L.; BARREAU, C.; ATANASOVA-PENICHON, V.; VERDAL-BONNIN, M. N.; PINSON-GADAIS, L.; RICHARD-FORGET, F. Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in *Fusarium* liquid cultures. **Mycological Research**, v. 113, n. 6/7, p. 746-753, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.02.010>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 160, de 1 de julho de 2022. Estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, n. 26, 6 jul. 2022. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/instrucao-normativa-anvisa-2022_160-1.pdf/view. Acesso em: 22 ago. 2023.

CAMARGOS, S. M.; SOARES, L. M. V.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J. L.; BORTOLLETO, N. Fumonisin in corn cultivars in the state of São Paulo. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 225-228, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822000000300015>.

CAPUTI, L.; MALNOY, M.; GOREMYKIN, V.; NIKIFOROVA, S.; MARTENS, S. A genome-wide phylogenetic reconstruction of family 1 UDP-glycosyltransferases revealed the expansion of the family during the adaptation of plants to life on land. **The Plant Journal**, v. 69, n. 6, p. 1030-1042, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113x.2011.04853.x>.

CHEYNIER, V.; COMTE, G.; DAVIES, K. M.; LATTANZIO, V.; MARTENS, S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, p. 1-20, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>.

CHIREMBA, C.; TAYLOR, J. R. N.; ROONEY, L. W.; BETA, T. Phenolic acid content of sorghum and maize cultivars varying in hardness. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 81-88, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.067>.

CHOWDHARY, V.; ALOOPARAMPIL, S. V.; PANDYA, R. G.; TANK, J. Physiological function of phenolic compounds in plant defense system. In: BADRIA, F. A.; BLUMENBERG, M. (ed.). **Phenolic compounds: chemistry, synthesis, diversity, non-conventional industrial,**

pharmaceutical and therapeutic applications. London: IntechOpen, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.101131>.

COSTA, R. V. da; QUEIROZ, V. A. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D. da; LANZA, F. E.; ALMEIDA, R. E. M. de; PEREIRA, A. A.; ALVES, R. R.; CAMPOS, L. J. M. Delaying harvest for naturally drying maize grain increases the risk of kernel rot and fumonisin contamination. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, p. 452-459, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-018-0234-0>.

GIORDANO, D.; BETA, T.; REYNERI, A.; BLANDINO, M. Changes in the phenolic acid content and antioxidant activity during kernel development of corn (*Zea mays* L.) and relationship with mycotoxin contamination. **Cereal Chemistry**, v. 94, n. 2, p. 315-324, 2017.

HAZEL, C. M.; PATEL, S. Influence of processing on trichothecene levels. **Toxicology Letters**, v. 153, n. 1, p. 51-59, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.040>.

HELENO, S. A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M. J.; FERREIRA, I. C. Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds: a review. **Food Chemistry**, v. 173, p. 501-513, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.057>.

HENIG, D. de O.; YAMAGUCHI, M. M.; TONIAL, I. B.; COELHO, A. R. Occurrence of fumonisin in corn and derivatives, intended for human consumption. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 31305-31321, 2020.

HOLGUÍN-ACUÑA, A. L.; CAVAJAL-MILLÁN, E.; SANTANA-RODRÍGUEZ, V.; RASCÓN-CHU, A.; MÁRQUEZ-ESCALANTE, J. A.; LEÓN-RENOVA, N. E.; GASTELUM-FRANCO, G. Maize bran/oat flour extruded breakfast cereal: a novel source of complex polysaccharides and an antioxidant. **Food Chemistry**, v. 111, n. 3, p. 654-657, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.034>.

KAWASHIMA, L. M.; SOARES, L. M. V. Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 3, p. 516-521, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000300005>.

LANZA, F. E.; ZAMBOLIM, L.; COSTA, R. V. da; SILVA, D. D. da; QUEIROZ, V. A. V.; PARREIRA, D. F.; MENDES, S. M.; SOUZA, A. G. C.; COTA, L. V. Aplicação foliar de fungicidas e incidência de grãos ardidos e fumonisinas totais em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 638-646, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500026>.

MAC JR., M.; SOARES, L. M. S. Fumonisin B1 and B2 in Brazilian corn-based food products. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, n. 10, p. 875-879, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1080/026520300420466>.

MYCOTOXINS: risks in plant, animal, and human systems. Ames: Council for Agricultural Science and Technology, 2003. 199 p. (Task Force Report, n. 139). Disponível em: <https://www.international-food-safety.com/pdf/Mycotoxins%20-%20Risks%20in%20Plant,%20Animals%20and%20Human%20Systems.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2023.

OMOTAYO, O. P.; OMOTAYO, A. O.; MWANZA, M.; BABALOLA, O. Prevalence of mycotoxins and their consequences on human health. **Toxicological Research**, v. 35, p. 1-7, 2019. DOI: <https://doi.org/10.5487/tr.2019.35.1.001>.

ORSI, R. B.; CORRÊA, B.; POSSI, C. R.; SCHAMMASS, E. A.; NOGUEIRA, J. R.; DIAS, S. M. C.; MALOZZI, M. A. B. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research**, v. 36, n. 1, p. 75-87, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(99\)00029-6](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(99)00029-6).

PASQUALI, M.; BEYER, M.; LOGRIECO, A.; AUDENAERT, K.; BALMAS, V.; BASLER, R.; BOUTIGNY, A. L.; CHRPOVÁ, J.; CZEMBOR, E.; GAGKAEVA, T.; GONZÁLEZ-JAÉN, M. T.; HOFGAARD, I. S.; KÖYCÜ, N. D.; HOFFMANN, L.; LEVIC, J.; MARIN, P.; MIEDANER, T.; MIGHELI, Q.; MORETTI, A.; MÜLLER, M. E. H.; MUNAUT, F.; PARIKKA, P.; PALLEZ-BARTHEL, M.; PIEC, J.; SCAUFLAIRE, J.; SCHERM, B.; STANKOVIC, S.; THRANE, U.; UHLIG, S.; VANHEULE, A.; YLI-MATTILA, T.; VOGELGSANG, S. A European database of *Fusarium graminearum* and *F. Culmorum Trichothecene* genotypes. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, article 406, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00406>.

PICOT, A.; ATANASOVA-PENICHON, V.; PONS, S.; MARCHEGAY, G.; BARREAU, C.; PINSON-GADAIS, L.; ROUCOLLE, J.; DAVEAU, F.; CARON, D.; RICHARD-FORGET, F. Maize kernel antioxidants and their potential involvement in *Fusarium* ear rot resistance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 14, p. 3389-3395, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf4006033>.

QUEIROZ, V. A. V.; ALVES, G. L. de O.; CONCEIÇÃO, R. R. P. da; GUIMARÃES, L. J. M.; MENDES, S. M.; RIBEIRO, P. E. de A.; VÉRAS, R. da C.; Occurrence of fumonisins and zearalenone in maize stored in family farm in Minas Gerais, Brazil. **Food Control**, v. 28, n. 1, p. 83-86, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.039>.

SCORZONI, L.; SANGALLI-LEITE, F.; SINGULANI, J. L.; PAULA E SILVA, A. C. A.; COSTA-ORLANDI, C. B.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Searching new antifungals: the use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. **Journal of Microbiological Methods**, v. 123, p. 68-78, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.02.005>.

XU, J.-G.; HU, Q.-P.; WANG, X.-D.; LUO, J.-Y.; LIU, Y.; TIAN, C.-R. Changes in the main nutrients, phytochemicals, and antioxidant activity in yellow corn grain during maturation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 5751-5756, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf100364k>.

Embrapa

Milho e Sorgo