INSTITUTO FEDERAL
Mato Grosso
Campus Cuiabá - Bela Vista

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS E MICOTOXINAS ASSOCIADAS AOS GRÃOS DE MILHO ARMAZENADOS NA REGIÃO DE SORRISO E SINOP – MT

ANDRÉ LUIZ ARENHARDT

CUIABÁ-MT
AGOSTO/2015

ANDRÉ LUIZ ARENHARDT

Orientador (a): Profa. Dra. Gilma Silva Chitarra
Coorientador (a): Profa. Dra. Solenir Ruffato

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS E MICOTOXINAS ASSOCIADAS AOS GRÃOS DE MILHO ARMAZENADOS NA REGIÃO DE SORRISO E SINOP – MT

Dissertação apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos na linha de pesquisa em Controle de Qualidade, para obtenção do título de mestre.

CUIABÁ – MT
2015

Divisão de Serviços Técnicos. Catalogação da Publicação na Fonte. IFMT Campus Cuiabá Bela Vista
Biblioteca Francisco de Aquino Bezerra

A681d

Arenhardt, André Luiz
Detecção e caracterização de fungos e micotoxinas associadas aos grãos de milho armazenados na região de Sorriso e Sinop – MT. / André Luiz Arenhardt._ Cuiabá, 2015.

75f.

Orientadora: Profª. Dra. Gilma Silva Chitarra
Coorientadora: Profª Dra. Solenir Ruffato

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tenologia de Alimentos)_. Programa de Pós-graduação. Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Mato Grosso.

1. Controle de qualidade – Dissertação. 2. Segurança alimentar – Dissertação. 3. Zea mays L. - Dissertação. I. Chitarra, Gilma Silva. II. Ruffato, Solenir. III. Título.

IFMT CAMPUS CUIABÁ BELA VISTA CDD 664
CDU
614.31:664.2.03

ANDRÉ LUIZ ARENHARDT

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS E MICOTOXINAS ASSOCIADAS AOS GRÃOS DE MILHO ARMAZENADOS NA REGIÃO DE SORRISO E SINOP – MT

Dissertação apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos e linha de pesquisa em Controle de Qualidade, para obtenção do título de mestre.

DATA DA APROVAÇÃO: 25/08/2015

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Gilma Silva Chitarra – IFMT *campus* Sorriso/Sinop

Profa. Dra. Solenir Ruffato – UFMT *campus* Sinop

Profa. Dra. Solange Maria Bonaldo – UFMT *campus* Sinop

Profa. Dra. Rozilaine Aparecida Pelegrine G. de Faria – IFMT *campus* Bela Vista

ATESTADO

Atesto terem sido realizadas as correções sugeridas pela Comissão Organizadora.

_____

Orientador (a): Gilma Silva Chitarra

Presidente da Comissão Examinadora

CUIABÁ-MT

2015

Com esforço e dedicação, saboreasse mais uma conquista.

A todos que de forma direta ou indireta proporcionaram e contribuíram na realização do presente trabalho,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio e incentivo dado em todos os momentos, mesmo estando distante e ausente em virtude dos estudos e trabalhos. À minha mãe, que sempre foi minha inspiração no mundo do conhecimento. Ao meu irmão pelo apoio e dedicação dispensados em momentos tempestuosos. Ao meu pai e irmã, tios e tias, avós e primos que estiveram na torcida pelo meu sucesso nessa caminhada, o meu sincero muito obrigado;

À Angela Raffaelli por toda força, dedicação e colaboração que em todo momento me ofereceu;

À Profª. Ph. D. Gilma Silva Chitarra que desde o início me conduziu no desenvolvimento do trabalho, auxílio nos projetos e bolsas. Pelos momentos empenhados nas orientações e correções, pela paciência e boa vontade dispensada;

Às Profª(s). Solenir Ruffato e Solange Maria Bonaldo pela colaboração com os laboratórios disponibilizados para realização do trabalho, pelos atendimentos, orientações, contribuições e correções realizadas;

A todos os professores do Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia em Alimentos, os quais ministraram aulas e se empenharam em mostrar um novo mundo repleto de conhecimento e oportunidades, em especial ao Profº. Dr. João Vicente Neto e Profª. Dra. Rozilaine A. P. G. de Faria pela colaboração e paciência dispensada;

Aos meus colegas de Mestrado pelos bons momentos vividos durante nossa caminhada, em especial a Krishna e Alle pelo auxílio quando precisado;

Aos alunos de Engenharia Agrícola e Ambiental e Engenharia Agronômica da UFMT, Mario, Angélica, Verônica, Bruna e ao mestrando Airton que dispenderam tempo e energia no auxílio dado durante o desenvolvimento do meu trabalho;

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso pelo programa do mestrado, pelas instalações e pelo corpo docente;

À Universidade Federal do Estado de Mato Grosso que nos permitiu a utilização dos laboratórios de Microbiologia/Fitopatologia e de Pós-Colheita de Grãos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso – FAPEMAT, edital universal 003/2014, pelo financiamento desta pesquisa;

A todos as unidades armazenadoras colaboradoras das cidades de Sorriso e Sinop que contribuíram na realização deste trabalho, permitindo a retirada das amostras de milho de seus armazéns;

À CAPES/FAPEMAT, edital universal 009/2013, processo Nº. 163671/2014 pela bolsa de estudos disponibilizada durante a realização do projeto.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1
Tabela 1 - Relação de fungos xerofílicos e sua atividade de água mínima e temperatura 24
Capítulo 2
Tabela 1 - Teor de água dos grãos de milho armazenados obtidos nas três coletas das unidades armazenadoras, localizadas nas cidades de Sorriso e Sinop/MT 56
Tabela 2 - Valores de atividade de água (Aa) nos grãos de milho armazenados obtidas nas três coletas, nas unidades de armazenamento das cidades de Sorriso (A a I) e Sinop (J a L)/MT, 2014. 57
Tabela 3 - Concentração ($\mu g.kg^{-1}$) de micotoxinas em grãos de milho armazenados nos municípios de Sorriso e Sinop/MT, coletados na safra 2014..... 66

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1
Figura 1 - Estrutura química das aflatoxinas B_1, B_2, G_1, G_2, M_1 30
Figura 2 - Estrutura química da fumonisina B_1 32
Figura 3 - Estrutura química da zearalenona 34
Capítulo 2
Figura 1 - Temperatura e umidade relativa do ambiente durante os períodos de coletas dos grãos de milho armazenados. 53
Figura 2 - Precipitação diária (mm) durante os períodos de coletas e armazenamento dos grãos de milho na região de Sorriso e Sinop/MT, 2014..... 54
Figura 3 - Curva de umidade de equilíbrio das amostras de grãos de milho coletados nas unidades armazenadoras das cidades de Sorriso e Sinop/MT, 2014..... 56
Figura 4 - Incidência média de fungos associados aos grãos de milho armazenados, por coleta realizada, submetidos ao ”blotter test” sem desinfestação, nas unidades armazenadoras das cidades de Sorriso e Sinop/MT, safra 2014. 58
Figura 5 – Incidência média de fungos associados aos grãos de milho armazenados, por coleta realizada, submetidos ao ”blotter test” com desinfestação, nas unidades armazenadoras das cidades de Sorriso e Sinop/MT, safra 2014. 63
Figura 6 – Incidência média de fungos associados aos grãos de milho em três coletas realizadas por unidade de armazenamento, sem desinfestação, nas cidades de Sorriso e Sinop/MT, safra 2014. 65
Figura 7 – Incidência média de fungos associados aos grãos de milho em três coletas realizadas por unidade de armazenamento, com desinfestação, nas cidades de Sorriso e Sinop/MT, safra 2014. 65

LISTA DE ABREVIATURAS

Aa	Atividade de Agua
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration
LMT	Limite Máximo Tolerado

RESUMO

Arenhardt, André Luiz. Detecção e caracterização de fungos e micotoxinas associadas aos grãos de milho armazenados na região de Sorriso e Sinop – MT. Dissertação (Mestrado). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, Campus Cuiabá – Bela Vista, 2015. 75p.

O milho é uma das principais culturas plantadas no Brasil e no mundo. Este cereal é matéria-prima constituinte de uma variedade de produtos e é destaque no cenário agroindustrial devido a sua importância econômica e nutricional. O milho é utilizado tanto *in natura* na alimentação humana e animal, como em complexos agroindustriais, farinhas, óleos e rações industrializadas. Significantes perdas de peso e qualidade dos grãos durante o período de armazenamento ainda são registradas, por ataque de insetos, fungos e roedores. Durante o período de armazenamento poderá ocorrer o desenvolvimento de fungos nos grãos causando a perda de peso/descoloração e produção de micotoxinas, o que representa um problema de saúde pública. Teve-se por objetivo com este estudo a detecção e caracterização de fungos e micotoxinas em grãos de milho armazenados nos municípios de Sorriso e Sinop/MT. As amostras de milho foram coletadas em unidades armazenadoras localizadas em Sorriso (9) e Sinop (3), da safra 2014. Teste de sanidade ou “Blotter test”, teor de água, atividade de água e a identificação e quantificação de micotoxinas nos grãos de milho armazenados coletados foram analisados. A identificação dos fungos foi realizada com o auxílio dos microscópios estereoscópio e composto. A ocorrência dos fungos (%) associados aos grãos com e sem desinfestação, foi respectivamente: *Fusarium* sp. (89 e 30), *Penicillium* sp. (70 e 0,5), *Cladosporium* sp. (61 e 0,5), *Aspergillus* sp. (50 e 1,7), *Rhizopus* sp. (16 e 0,1) e *Nigrospora* sp. (0 e 0,5), respectivamente. O teor de água dos grãos variou entre 6,43 a 10,60% e a atividade de água variou entre 0,32 a 0,61. A micotoxina fumonisina foi detectada em 100% das amostras, com variação da concentração entre 2.829 e 23.630 $\mu g.kg^{-1}$. A aflatoxina foi detectada em 60% das amostras, com variação da concentração de 1,31 a 3,40 $\mu g.kg^{-1}$. A zearalenona não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas. Neste estudo, o fungo *Fusarium* sp. ocorreu com alta incidencia em grãos de milho armazenados em Sorriso e Sinop, produzindo fumonisinas. A concentração de fumonisinas presentes nas amostras está acima do limite tolerado pela RDC 07/2014, sugerindo que o consumo deste produto pode causar problemas de saúde.

Palavras-chave: Armazenamento, Controle de Qualidade, Segurança alimentar, *Zea mays* L.
Agência Fomento: FAPEMAT - processo Nº. 163671/2014.
Bolsa de estudos: CAPES/FAPEMAT

ABSTRACT

Maize is the most important crop grown in Brazil and in the world. This cereal is constituent raw material of a variety of products, is highlighted in the agro-industrial setting due to their economic and nutritional importance. Maize is used both *in natura* in food and feed, as in agroindustrial complex, flour, oils and industrialized feed. Significant loss of weight and quality during the storage period are still registered resulting from the attack of insects, fungi and rodents. During the storage period may occur the development of fungi grains causing weight loss / discoloration and mycotoxin production, which are a public health problems. This research aimed to detect fungi and mycotoxins in maize grain stored in the cities of Sorriso and Sinop / MT. The samples of maize were collected in storage units located in Sorriso (9) and Sinop (3) on crop season 2014. Sanity test or "Blotter test", water content, water activity, identification and quantification of micotoxins from stored grains of maize were analyzed. The fungi identification was carried out with the aid of a stereoscope and optical microscope. The occurrence of fungi (%) related to the grains with and without disinfection was: *Fusarium* sp. (89 and 30), *Penicillium* sp. (70 and 0.5), *Cladosporium* sp. (61 and 0.5), *Aspergillus* sp. (50 and 1.7), *Rhizopus* sp. (0.1 and 16) and *Nigrospora* sp. (0 to 0.5), respectively. The water content ranged from 6,43 to 10,60% and water activity ranged from 0,32 to 0,61. Fumonisin was detected in 100% of the samples with varying from 2.829 to 23.630 $\mu g.kg^{-1}$. Aflatoxin was detected in 60% of samples ranging in concentration from 1.31 to 3.40 $\mu g.kg^{-1}$. Zearalenone has been detected in any sample analyzed. In this study, the fungus *Fusarium* sp. occurred with high incidence in maize grain stored in Sorriso and Sinop, producing fumonisins. The fumonisin concentration present in samples is above the limit tolerated by RDC 07/2014, suggesting that this product consumption may cause health problems.

Keywords: Food Safety, Quality Control, Storage, *Zea mays*
Promotion agency: FAPEMAT - process Nº. 163671/2014
Scholarship: CAPES/FAPEMAT

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES INICIAIS
1. INTRODUÇÃO 13
2. REFERENCIAL TEÓRICO 15
2.1 Importância da cultura do milho 15
2.2 Qualidade de grãos de milho 16
2.3 Associação de fungos aos grãos 19
2.3.1 Fatores relacionados à contaminação fúngica 20
2.3.1.1 Temperatura 20
2.3.1.2 Teor de água dos grãos armazenados 21
2.3.1.3 Umidade de equilíbrio 22
2.3.1.4 Atividade de água 23
2.4 Armazenamento de grãos 24
2.5 Micotoxinas em grãos 25
2.5.1 Aflatoxinas 28
2.5.2 Fumonisinas 31
2.5.3 Zearalenona 33
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 36
CAPÍTULO 2: IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FUNGOS E MICOTOXINAS EM GRÃOS DE MILHO ARMAZENADOS NA REGIÃO MÉDIO NORTE DE MATO GROSSO/BRASIL 44
RESUMO 46
ABSTRACT 47
1. INTRODUÇÃO 48
2. MATERIAL E MÉTODOS 50
2.1 Local do estudo 50
2.2 Condições ambientais da região 50
2.3 Coleta e preparo das amostras 50
2.4 Determinação do teor de água 51
2.5 Determinação da atividade de água (Aa) 51
2.6 Detecção e identificação da microbiota fúngica 51
2.7 Detecção e quantificação de micotoxinas 52
2.7.1 Aflatoxinas 52
2.7.2 Fumonisinas 52
2.7.3 Zearalenona 52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 52
3.1 Condições ambientais da região 52
3.2 Determinação do teor de água dos grãos 54
3.3 Atividade de água (Aa) dos grãos 56
3.4 Qualidade sanitária dos grãos de milho armazenados 57
3.5 Ocorrência de Micotoxinas 66
4. CONCLUSÕES 71
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 72

CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

A importância econômica da cultura do milho é caracterizada pelas diversas formas de sua utilização, constituindo-se em indispensável matéria-prima para diversificados complexos agroindustriais. O grão de milho pode ser utilizado como componente básico na alimentação humana, *in natura*, ou como farinhas, óleo, amido e também na alimentação animal ou em rações industrializadas (KOBLITZ, 2011).

O estado de Mato Grosso é o maior produtor de milho do país e tem o cereal como sua segunda cultura mais cultivada, tendo como primeira a cultura da soja. Entretanto, com a grande produção e o número insuficiente do sistema de armazenagem do estado para suprir a demanda de estocagem geram problemas dentro da cadeia produtiva do milho (CONAB, 2015).

Apesar dos avanços da produtividade da cultura do milho no Brasil, problemas com a qualidade dos grãos produzidos têm causado preocupações dos envolvidos na cadeia produtiva de alimentos derivados deste cereal, devido aos altos riscos e prejuízos que podem ser causados pela baixa qualidade dos grãos, principalmente pela presença de fungos e micotoxinas.

A qualidade do milho pode ser afetada durante todas as fases de produção, podendo ser causada pela má qualidade da semente utilizada no plantio, inadequado preparo do solo, falhas no processo de colheita e armazenamento, além da associação de fungos aos grãos e a presença de insetos e roedores nas unidades de armazenamento, resultando em perdas de qualidade.

Durante o período de armazenamento, podem-se iniciar processos deteriorativos, devido à presença de contaminantes nas fases de pré e pós-colheita, tais como, contaminantes físicos, químicos e biológicos. A presença de fungos pode causar danos aos grãos, como perda de peso, descoloração, necrose e perda nutricional. Além disso, alguns fungos potenciais produtores de micotoxinas podem desenvolver-se nos grãos e produzir essas substâncias tóxicas ocasionando problemas de saúde pública. Os fungos associados aos grãos podem ser provenientes do campo e/ou podem desenvolver-se durante o armazenamento.

A qualidade e o manejo dos grãos durante o armazenamento são informações relevantes para a redução de perdas nutricionais e econômicas. Para obtenção dessas informações, a detecção dos fungos e identificação de micotoxinas em grãos armazenados, são medidas a serem adotadas para caracterização dos tipos de fungos associados aos grãos, com o controle da produção de substâncias tóxicas e prevenção de doenças alimentares.

Desta forma, considerando que a associação de fungos e micotoxinas aos grãos de milho armazenados pode representar um problema de saúde pública e econômico, fica demonstrada a necessidade da realização do presente estudo, com objetivo de caracterizar e identificar fungos e micotoxinas associadas aos grãos de milho armazenados na região de Sorriso e Sinop no estado de Mato Grosso, onde o tema será tratado no capítulo 2. O capítulo 2 apresenta a identificação e quantificação de fungos e micotoxinas em grãos de milho armazenados na região Médio Norte de Mato Grosso/Brasil e foi escrito de acordo com as normas para publicação na ***Revista Segurança Alimentar e Nutricional.***

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância da cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é nativo das Américas e constitui o mais importante cereal desse continente, tendo-se originado no México, onde evidências arqueológicas indicam que era domesticado e cultivado em 5000 a.C (KOBLITZ, 2011).

O milho é uma monocotiledônea de distribuição mundial pertencente à família *Poaceae*, do gênero *Zea,* espécie *zea mays* (FANCELLI, 1983). Por ser uma cultura de alta adaptabilidade aos diferentes ecossistemas, essa cultura é amplamente difundida e cultivada no mundo (QUEIROZ et al., 2009; CONAB, 2013).

A importância da cultura do milho na economia mundial tem relevância em função das suas diversas formas de utilização, que vão desde a alimentação humana e animal até as indústrias de alta tecnologia. O uso pode ser direto no preparo caseiro (*in natura*, pipoca, pães, bolos, farofas), na indústria de alimentos (amidos, fubás, farinhas comuns, óleo, glicose, dextrose), pelo uso direto animal (silagem, grãos inteiros/desintegrados) e indústrias de rações (para aves, suínos e bovinos, além de outros mamíferos) (KOBLITZ, 2011).

A maior parte da produção de milho mundial tem destino à alimentação animal de aves, suínos e bovinos, representando em torno de 70%. O restante é destinado ao consumo humano e a indústria de alimentos. No Brasil, em 2014, foram produzidos aproximadamente 67 milhões de toneladas de ração, sendo 80% a base de milho, enquanto nos Estados Unidos, cerca de 50% da produção é destinado para esse fim (FORNASIERI, 2007; CONAB, 2014; SINDIRAÇÕES, 2014).

A produção mundial de milho no ano safra de 2014 foi de 988,07 milhões de toneladas, sendo os Estados Unidos o maior produtor, com safra recorde de 361 milhões de toneladas. Apesar do aumento do consumo mundial de 944,91 para 968,90 milhões de toneladas deste cereal, a produção ainda permanece acima da demanda, mantendo um estoque de passagem em aproximadamente 190 milhões de toneladas (CONAB, 2014).

A cultura do milho no Brasil na safra de 2014 foi de 15 milhões de hectares com uma produção de 78,4 milhões de toneladas, representando 39,29% de grãos produzidos em território nacional, ficando na posição de segundo lugar e a cultura da soja em primeiro. Houve um decréscimo de 4,2% na área total plantada e 2,1% na produção, respectivamente, causados principalmente pelas condições climáticas e comercialização de grãos (CONAB, 2015).

No estado de Mato Grosso, a cultura do milho tem papel fundamental no cenário agrícola, colocando o estado como maior produtor nacional do cereal nos anos de 2013 e 2014, com aproximadamente 3 milhões de hectares plantados e com uma produção de 17,6 milhões de toneladas na safra 2014 (CONAB, 2015).

A região médio-norte do estado de Mato Grosso, onde os municípios de Sorriso e Sinop estão localizados, tem uma área cultivada estimada em 1,5 milhões de hectares cultivados de milho, com uma produção estimada em 7,7 milhões de toneladas de grãos para o ano safra de 2014 (IMEA, 2014).

O município de Sorriso ganha destaque dentro do estado devido a produção de grãos de milho, com uma área cultivada em 2014 de 371.800 hectares e uma produção de aproximadamente 2 milhões de toneladas. No município de Sinop, a área cultivada foi de 79 mil hectares, com uma produção de 388.680 toneladas do cereal (IBGE, 2015).

2.2 Qualidade de grãos de milho

O termo qualidade é remetido sempre à finalidade do uso do grão, logo o comprador final deve especificar as características desejadas do grão de modo que o responsável pelo processamento ou produção possa fornecer um produto que atenda às necessidades do comprador a um baixo custo. Portanto, tanto produtores, quanto compradores devem estar cientes da importância dos critérios pretendidos para a comercialização, pois diferentes compradores de grãos requerem propriedades qualitativas distintas (SILVA, 2008).

De modo geral, os padrões de qualidade de grão de milho para fins comerciais, estão baseados na pureza do grão, cor, quantidade de grãos quebrados, índice de

grãos rachados, material estranho, danificados (incluindo por efeitos de calor de secagem, influência do tempo, insetos e doenças), teor de água, massa específica, teor de proteínas e óleo, presença de fungos e presença de micotoxinas (GERMANI, 2004; SILVA, 2008).

No entanto, fatores que interferem na qualidade dos grãos podem estar relacionados desde o plantio da semente no campo até os processos de industrialização, dependendo da sanidade da semente utilizada, adubação, controle de pragas, doenças e plantas daninhas, utilizados no manejo da cultura. Todos os grãos estão expostos, tanto no campo quanto no armazenamento, à ação de fatores físicos, químicos e biológicos, que interagem entre si favorecendo o processo de deterioração (ALMEIDA et al., 2005).

Segundo Pimentel e Fonseca (2011) os procedimentos na colheita, transporte e armazenamento realizados de forma inadequada afetam a qualidade do grão. A colheita de grãos com alto teor de água pode resultar na perda do produto, quando associado a altas temperaturas, alta umidade relativa do ar e nutrientes disponíveis nos grãos, pois proporciona substrato ideal para o ataque de insetos e fungos.

O processo de beneficiamento de grãos tem por finalidade a eliminação de contaminantes presentes nos grãos e manutenção das condições dos grãos. O fluxograma do processo de beneficiamento de grãos segue as etapas de recepção, pré-limpeza, armazenamento no silo pulmão, limpeza, secagem, separação e classificação, armazenamento a granel, classificação, tratamentos, embalagem (comercialização em fardos), armazenagem comercial. A qualidade, conservação e a preservação do grão podem ser comprometidas, afetando a qualidade nutricional e sensorial dos grãos se as etapas do beneficiamento forem realizadas de forma inadequada (PAES, 2006).

O processo de secagem aplicado tem a finalidade de reduzir o teor de água de produtos agrícolas. Por esse processo, é reduzida a disponibilidade de água para o desenvolvimento de fungos, o que evita o surgimento de grãos ardidos e a produção de micotoxinas pelos fungos. A redução de água diminui o processo respiratório dos grãos e consequentemente diminui a perda de peso do grão e a geração de calor. A

redução do metabolismo minimiza a execução de reações bioquímicas que promovem a auto degeneração do produto (SILVA 2010).

A redução do teor de água dos grãos envolve ao mesmo tempo processos de transferência de calor e massa, o que pode alterar de forma substancial a qualidade e as propriedades físicas do produto, dependendo do método e das condições de secagem e dos contaminantes presentes (RIBEIRO et al., 2005).

Na maioria dos processos agrícolas, o teor de água, a temperatura, a massa específica e a porosidade variam consideravelmente a cada etapa e de ponto a ponto no interior de uma massa de grãos, tendo como resultado uma difusividade térmica variável dentro de um determinado processamento (ANDRADE et al., 2003).Condições de armazenamento, que promovem um aumento da intensidade da respiração dos grãos, produzem mudanças nas propriedades físicas e químicas, que os tornam impróprios para o consumo "*in natura*" ou processamento industrial. (SILVA, 2010).

Durante o armazenamento, outros fatores podem influenciar no processo deteriorativo dos grãos de milho, como a umidade do ambiente e a temperatura do ar (SILVA, 2008), a localização e severidade de danos mecânicos, taxa de crescimento de patógenos, condição fisiológica inicial do grão, características genéticas do cultivar e contaminantes presentes nos grãos (BEWLEY; BLACK, 1994).

Independentemente do grau de tecnologia usado para o armazenamento de grãos, a limpeza do local onde será armazenado o produto é de fundamental importância. Grãos limpos podem ser armazenados por mais tempo, quando comparados com grãos contendo impurezas (SILVA, 2008).

Conforme Queiroz et al. (2009), os contaminantes associados aos grãos de milho armazenados podem ser de natureza química, física ou biológica. A contaminação química pode ser proveniente de micotoxinas, resíduos de pesticidas e metais pesados. Os contaminantes de natureza biológica podem ser os microrganismos patogênicos, pombos e roedores e os contaminantes de natureza física podem ser fragmentos de insetos, vidros, pedras e materiais estranhos. Os principais contaminantes do milho são os fungos toxigênicos e a produção de micotoxinas, insetos-praga, roedores, pombos e agroquímicos.

2.3 Associação de fungos aos grãos

A contaminação de grãos por fungos pode variar de acordo com a qualidade das sementes, condições ambientais, tais como temperatura, umidade relativa do ar e atividade de água do substrato, colheita tardia, grãos processados com umidade alta, armazenamento inadequado dos grãos e métodos de processamento na unidade de beneficiamento (SILVA, 2010).

A associação dos fungos aos grãos ocorre em duas condições: na fase de pré-colheita, causando danos como podridões de espigas, com a formação de grãos ardidos, e na fase de pós-colheita, durante o beneficiamento, armazenamento e transporte, resultando em grãos mofados ou embolorados. Dentre os fungos que causam danos aos grãos de milho, destacam-se as espécies dos gêneros: *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Cephalosporium* sp. e *Stenocarpella* sp. (PINTO, 2005).

Os fungos podem estar associados aos grãos de milho, causando deterioração severa e potencial para produção de micotoxinas, comprometendo a qualidade dos grãos por serem nocivas à saúde humana e animal (CAST, 2003).

Os fungos presentes nos grãos são classificados em dois grupos conforme suas exigências de água: fungos de campo e fungos de armazenamento. Os fungos de campo colonizam as sementes/grãos ainda no campo e necessitam de elevada umidade relativa do ar (90% UR) e elevados teores de água nos grãos, entre 20 e 21%, para o seu desenvolvimento. Nesse grupo, predominam as espécies dos gêneros *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Helminthosporium* sp. e *Fusarium* sp (LAZZARI, 1997; ALMEIDA, 2005; SILVA, 2010).

Quanto aos fungos de armazenamento, requerem umidades entre 13 e 18%, sendo pouco frequentes durante o crescimento da planta no campo e nos grãos recém-colhidos. Esses fungos são organismos que em sua maioria se desenvolvem em atmosfera com umidade relativa (UR) entre 65 e 95%, e com atividade de água (Aa) baixa e alta pressão osmótica. Nesse grupo, os principais fungos encontrados são dos gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. (CHRISTENSEN, 1974; LAZZARI, 1997; PINTO, 2005), destacando-se as espécies de *Aspergillus restritus*, *A. versicolor, A.*

parasiticus, A. flavus e A. niger. e de *Penicillium expansum*, *P. ochraceus e P. verrucosum.*

Os grãos de milho e seus derivados podem estar associados a fungos potencialmente toxigênicos, com predominância dos fungos dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, e produção de seus metabólitos secundários, que podem causar intoxicações agudas e crônicas nos homens e nos animais. As micotoxinas desenvolvem em condições ideais na faixa de umidade do ar intergranular entre 68 e 90%, teor de água dos grãos entre 12 e 18% e a temperaturas de 25 a 27 °C (ALMEIDA, 2005; SILVA, 2010).

Os gêneros *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., fungos de armazenamento, podem ocorrer em condições de campo, com potencial de produção de micotoxinas. Esses fungos podem infestar ou infectar os grãos podendo causar sua deterioração (LAZZARI, 1997; PINTO, 2005).

2.3.1 Fatores relacionados à contaminação fúngica

2.3.1.1 Temperatura

Um dos fatores ambientais importantes que afetam a multiplicação de microrganismos é a temperatura, sendo crucial na interação de fatores bióticos e abióticos que promovem a deterioração de grãos durante o período de armazenamento (FRANCO, 2008).

O desenvolvimento e a vida do microrganismo somente ocorrem em faixas preferenciais de temperatura, onde cada grupo de microrganismos tem sua temperatura ótima de crescimento. Entretanto, as alterações alimentares podem se verificar a qualquer temperatura, principalmente dentro do extenso limite de 5 a 70 ºC (EVANGELISTA, 2008).

Comumente, os grãos são colhidos secos ou podem ter seu teor de água reduzido a um nível de segurança para ser armazenado, passando este a ter um papel menos importante que o da temperatura. Os fungos mais comuns de armazenamento têm uma temperatura ótima de crescimento de 28 a 32 ºC e mínima de 0 a 5 ºC (FRANCO, 2008).

2.3.1.2 Teor de água dos grãos armazenados

A determinação do conteúdo de água dos grãos é importante para a comercialização do produto, pois a maior ou menor quantidade de água influencia diretamente no peso dos grãos. Para o armazenamento do produto por períodos prolongados, a maior disponibilidade de água pode acelerar os processos deteriorativos e comprometer a qualidade da matéria-prima (PIMENTEL; FONSECA, 2011).

As exigências de teores de água podem variar entre as espécies de fungos, tanto no limite mínimo de umidade para crescimento, quanto no intervalo de tempo do armazenamento dos grãos. Os fungos são adaptados a desenvolverem em materiais com umidade em equilíbrio com a umidade relativa de 65 a 70% e 85 e 90%, correspondendo a teores de água de 13 a 20% em grãos de milho (LAZZARI, 1997; FRANCO, 2008).

No processo de secagem a determinação de umidade é fundamental, pois através desta determinação, é indicado qual teor de água deverá ser alcançado, e é uma das medidas importantes e utilizadas na análise de alimentos. A umidade de um alimento está relacionada com sua estabilidade, qualidade e composição, podendo afetar as características do produto (SILVA, 2008).

A variação da umidade dos grãos está diretamente ligada às variações das propriedades físicas como massa específica aparente, massa específica real, porosidade, massa de 1.000 grãos, entre outras (SILVA; CORRÊA, 2000).

Como principal fator para processos microbiológicos, o conhecimento do teor de água da matéria-prima é de fundamental importância na conservação e armazenamento, na manutenção da qualidade e no processo de comercialização. Em armazenagem ideal, os grãos precisam ter teor de água inferior a 13% ou ter umidade intergranular mantida entre 65 a 70%, para uma armazenagem a longo prazo, é recomendável umidade intergranular de 65% e umidade do grão entre 12 e 13% (LAZZARI, 1997; FRANCO, 2008).

2.3.1.3 Umidade de equilíbrio

Os grãos têm a capacidade de ceder ou absorver água do ambiente durante processo de secagem e armazenagem, com tendência de manter o equilíbrio entre o seu teor de água e as condições do ar ambiente (RESENDE et al., 2007). A umidade de equilíbrio dos grãos é função ou depende da temperatura ambiente, da umidade relativa do ar e das condições físicas do grão (SILVA, 2008).

Quando a umidade dos grãos está em equilíbrio com o ar ambiente, a razão da perda de umidade dos grãos para o ambiente é igual à razão ganho de umidade, sendo denominado de umidade de equilíbrio ou equilíbrio higroscópico. A umidade de equilíbrio é observada após os grãos serem expostos por um período de tempo prolongado a uma determinada condição ambiental (BROOKER et al, 1992; SILVA, 2008).

A relação entre a umidade de determinado produto e a correspondente umidade relativa de equilíbrio, em uma determinada temperatura, pode ser expressa por meio de curvas, denominadas “Isotermas de Equilíbrio”. Os valores de umidade de equilíbrio são diferentes para quando os grãos ganham água (adsorção) e quando perdem água (dessorção), fenômeno este denominado de histerese. O fenômeno de histerese ocorre entre a curva de secagem e o reumedecimento do produto, pois a velocidade de adsorção de água pelo grão é muito mais lenta que a velocidade de dessorção (SILVA, 2008).

Os dados de umidade de equilíbrio podem ser estimados por equações, como por exemplo, pela equação de Chun-Pfost modificada (Equação 1), descrita em Silva (2008).

$$U_e = a - b \{ \ln [- (T + c) \ln UR] \} \quad (1)$$

U_e: umidade de equilíbrio, decimal b.s.; a, b, c: constantes dependentes do produto (milho: a = 0,339, b = 0,059 e c = 30,205); T: temperatura do ar, ºC; UR: umidade relativa, decimal.

2.3.1.4 Atividade de água

Os microrganismos necessitam de água para sua sobrevivência, metabolismo e multiplicação, bem como exigem a presença de água na forma disponível, sendo que a água ligada a macromoléculas por forças físicas não está livre para agir como solvente ou na participação de reações químicas, não podendo assim, ser aproveitada pelos microrganismos. O parâmetro utilizado para medir a disponibilidade de água em um alimento é denominado como “atividade de água” (Aa) (FRANCO, 2008).

Carvalho (1997) e Franco (2008) afirmam que a atividade de água influencia na proliferação de agentes patogênicos. A medida de energia da água, que indica a quantidade de “água livre” na amostra refere-se às moléculas de água presentes nos produtos e que não estão química ou fisicamente ligadas. A atividade de água é o quociente da pressão de vapor do produto analisado sobre a pressão de vapor de água pura, em uma mesma temperatura.

Atividade de água (Aa) é um índice utilizado para expressar a disponibilidade de água na camada delgada de ar junto à superfície de produtos de origem animal ou vegetal. Este índice varia de 0 a 1. Quanto maior o teor de água do produto maior é o índice de atividade de água. Os fungos necessitam de valores que variam de 0,65 a 0,90, sendo que dentro desta faixa, o teor de água da massa de grãos pode variar de 14 a 28% (NASCIMENTO et al., 2012).

Taniwaki e Silva (2001) apresentam fungos que se desenvolvem com baixa atividade de água e temperaturas que variam entre 22 a 40°C. Fungos denominados xerofílicos são capazes de se desenvolver em atividades de água abaixo de 0,85 e não necessitam de condições especiais de crescimento (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação de fungos xerofílicos e sua atividade de água mínima e temperatura**.**

Espécie fúngica	Atividade de água mínima	Temperatura (ºC)
Aspergillus candidus	0,75	25
A. conicus	0,70	22
A flavus	0,78	33
A. fumigatus	0,82	40
A. niger	0,77	35
A. ochraceus	0,77	25
A. restrictus	0,75	25
A. tamarii	0,78	33
A. terréus	0,78	37
A. versicolor	0,78	25
A. wentii	0,84	25
Penicillium crysogenum	0,79	25
P. cyclopium	0,81	25
P. expansum	0,83	23
P. frequentans	0.81	23
P. inslandincum	0,83	31
P. viridicatum	0,81	23

Fonte: Taniwaki e Silva (2001).

2.4 Armazenamento de grãos

O armazenamento de grãos é constituído por um conjunto de procedimentos destinados a manutenção da qualidade dos grãos, possibilitando um ambiente no qual as mudanças fisiológicas e bioquímicas ocorram em um nível aceitável. Desta forma, o setor de armazenamento de grãos torna-se de fundamental importância na cadeia produtiva entre a produção e utilização das safras agrícolas, tendo fortes influências socioeconômicas na disponibilidade e na qualidade dos alimentos (PUZZI, 2000).

A finalidade principal do sistema de armazenagem é de garantir o fluxo de abastecimento constante, proporcionando maior estabilidade de preços e de mercado. Sendo assim, é necessário que a rede de armazenagem pertença a um sistema integrado, com a finalidade de dinamizar a comercialização, reduzir custos e beneficiar os agentes de produção e consumidores (SILVA, 2008).

O sistema de armazenagem dentro da cadeia produtiva do milho é uma das carências na produção agrícola local e nacional. Na região Centro-Oeste o sistema de

armazenagem apresenta uma peculiaridade que se destaca com mais intensidade das demais regiões. A carência de armazéns nas microrregiões e a concentração da capacidade estática das empresas de recebimento da soja gera a falta de espaços localizados para o recebimento de outros produtos, tal como o milho (CONAB, 2013).

Como saída para esse problema, os produtores armazenam os grãos de forma improvida em silos-bag ou fazem o armazenamento dos grãos fora dos armazéns, com exposição aos intemperes do tempo.

O armazenamento inadequado de grãos de milho em condições improvisadas, dentro e fora dos armazéns, pode resultar em perdas quantitativas e qualitativas nos grãos. Quando há associação de fungos aos grãos armazenados em condições inadequadas, pode comprometer a qualidade dos mesmos, resultando no seu desenvolvimento. Para alguns fungos potencialmente toxigênicos, quando em condições ideais podem produzir micotoxinas e ser um risco para a segurança alimentar de humanos e animais (PUZZI, 2000; PIMENTEL; FONSECA, 2011).

2.5 Micotoxinas em grãos

O termo micotoxina é derivado da palavra grega “mykes”, que significa fungo, e do latim “toxican”, que significa toxinas. As micotoxinas são metabólitos secundários de fungos filamentosos, e são tóxicas ao homem e animais mesmo se ingerido em pequenas concentrações (PITT, 2000; MALLMANN; DILKIN, 2007).

Micotoxinas são substâncias capazes de alterar atividades imunomediadas (BLACK et al., 1992), ou produzir efeitos tóxicos agudos, carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos e estrogênicos em animais dependendo do nível de exposição (VAN EGMOND, 1989).

Segundo FDA (2013), a potencialidade de um produto conter uma micotoxina naturalmente presente depende se o produto contém e suporta o crescimento de uma espécie de fungos produtores de micotoxinas, e se a temperatura e umidade são ótimas para seu desenvolvimento.

As micotoxinas de interesse do ponto de vista da saúde humana e animais incluem as aflatoxinas (AFS) de *Aspergillus,* fumonisinas (FBS) e zearalenona (ZEA) de espécies de *Fusarium* (CAST, 2003).

A ocorrência das micotoxinas pode se dar de forma simultânea em cereais com potencial de interação e efeitos toxicológicos entre elas, com resposta mais alta de toxicidade quando as micotoxinas agem juntas (HARVEY et al., 1995; LOPEZ GARCIA et al., 1999). A correlação positiva entre a ocorrência de aflatoxinas B_1 e B_2 e fumonisinas B_1 e B_2 em produtos alimentícios foram identificadas por Harvey et al. (1995) e Borutova et al. (2012).

A ocorrência de micotoxinas no período de pré e pós-colheita é favorecida em regiões que apresentam características climáticas com alta umidade e altas temperaturas (SCF, 2002).

A presença de micotoxinas em alimentos é um sério problema para a saúde pública e para a qualidade dos alimentos devido aos seus malefícios. Apesar do conhecimento sobre a toxicidade dos metabólitos secundários produzidos por inúmeras espécies de fungos filamentosos e da crescente preocupação em se investigar e evitar intoxicações, ainda são registrados surtos de micotoxicoses no mundo (FAO, 2013).

Surto de aflatoxicose foi reportado em 1974 na Índia, com 106 mortes decorrentes da ingestão de milho contaminado, e no Quênia em 2004, 125 pessoas morreram em um surto de aflatoxicose também por ingestão de milho contaminado (FAO, 2012).

No Brasil, em maio de 2006, 24 casos de Beribéri foram notificados no estado do Maranhão, sendo atribuída a ingestão de arroz contaminado pela micotoxina citreoviridina. Analises laboratoriais mostraram presença de vários fungos, entre eles o *Penicillium citreonigrun* (BRASIL, 2007a; BRASIL, 2007b).

Em lavouras envolvidas com produção de alimentos, 25% estão contaminadas com algum tipo de micotoxina (FAO, 2013). Principalmente, em países localizados na África, muitos casos de micotoxicoses podem estar ocorrendo devido à ingestão de alimentos contaminados, pois as legislações não contemplam níveis mínimos de

ingestão e presença de micotoxinas, resultando em falta de controle e levantamentos que não retratam a realidade do país.

O crescimento de fungos em grãos, quando controlado, indiretamente impossibilita a produção de micotoxinas. Por outro lado, a inexistência de sinais de contaminação fúngica não isenta completamente o alimento da presença de toxinas, uma vez que elas podem permanecer no produto mesmo depois da eliminação dos fungos (PINTO, 2005).

A contaminação por micotoxinas pode variar de acordo com as condições ambientais tais como nutrientes, luz, oxigênio, temperatura, pH, umidade relativa do ar e atividade de água do substrato, produção e manejo da cultura, armazenamentos dos produtos e métodos de processamento, fazendo com que a estimativa de contaminação seja uma tarefa extremamente complexa (FAO-WHO, 2001; PARIZZI, 2012).

Segundo Fernández et al. (1994), a contaminação humana por micotoxinas pode ocorrer por duas vias, direta e indireta. A direta constitui a contaminação por produtos de origem vegetal. A indireta ocorre pelo acúmulo de resíduos de micotoxinas nos produtos de origem animal, como carnes, vísceras, ovos e leite.

A toxicidade destas toxinas levou muitos países a configuração de normas rígidas para o seu controle em alimentação humana e animal e a consequente criação de legislação para controlar suas possíveis contaminações (JUAN et al., 2013). Na escala mundial, o Comitê Conjunto de Peritos sobre Aditivos Alimentares (JECFA), o Conselho Consultivo Científico da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da FAO, são responsáveis pela avaliação dos riscos relacionados com micotoxinas. Na União Europeia (EU), a questão das micotoxinas é cientificamente atendida pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), na qual aconselha a Comissão Europeia.

Os estabelecimentos de níveis máximos de presença de micotoxinas iniciaram em 2001, constituindo regulamento que substituiu antigas resoluções nacionais existentes na época. Os regulamentos são atualizados, substituído em 2006 pelo regulamento da EU 1881/2006, com atualizações em 2007 e 2010.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece os limites máximos de micotoxinas tolerados em alimentos, através da resolução nº7, de 18 de fevereiro de 2011. Segundo a resolução o prazo para a atualização dos limites máximos de micotoxinas era previsto para janeiro de 2014 e 2016, porém a RDC nº 59, de 26 de dezembro de 2013, prorrogou para 1º de janeiro de 2017 o prazo máximo de adequação estabelecidos nos artigos 11 e 12 e respectivos anexos III e IV da Resolução - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011.

2.5.1 Aflatoxinas

A aflatoxicose é uma doença que resulta da ingestão de aflatoxinas em alimentos contaminados. As aflatoxinas são um grupo de substâncias toxicas produzidas por certas estirpes de fungos, geralmente formados por *A. flavus* e *A. parasiticus,* são nomeadas por letras e subscrito, e sob condições favoráveis de temperatura e umidade, esses fungos se desenvolvem em certos alimentos, produzindo a micotoxina.

As aflatoxinas foram descobertas após estudos toxicológicos quando a toxina foi associada à morte de 100.000 perus na Inglaterra, bem como a alta incidência de doenças hepáticas em patos no Quênia e de trutas criadas nos Estados Unidos por toxinas produzidas por fungos da espécie do *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* (SARGENT et al., 1963).

Inicialmente, foram identificados quatro metabólitos diferentes formados a partir da aflatoxina. Quando os grãos contaminados eram expostos a luz negra, os metabolitos brilhavam em azul (metabolitos B) ou verde-amarelado (metabólitos G), sendo isolados duas toxinas distintas (B_1, B_2, G_1, G_2). Os números subscritos referem-se ao padrão de separação cromatográfico. Pesquisas posteriores descobriram outros metabólitos, com dois encontrados no leite (M_1 e M_2) e urina de lactantes. Aflatoxinas M_1 e M_2 são produzidas a partir das aflatoxinas B por hidroxilação em animais lactantes e são excretadas no leite e urina. Aflatoxinas são mais comumente encontradas em nozes, amendoim, e sementes oleaginosas, incluindo o caroço de algodão e o milho (USDA, 2006).

A aflatoxina B_1, a substância considerada mais tóxica, produzida pelo *A. flavus*, é geralmente associada com a aflatoxina B_2. As aflatoxinas G_1 e G_2 são formadas apenas por *A. parasiticus* (KLICH; PITT, 1988; FDA, 2015).

A ocorrência destas micotoxinas em produtos de consumo diário e principalmente no leite propicia um risco em particular aos humanos pelos seus efeitos negativos em produtos alimentícios para adultos e especialmente para crianças (PRANDINI et al., 2009).

Aflatoxinas produzem necrose aguda, cirrose e carcinoma do fígado em animais, sendo que nenhuma espécie é resistente aos efeitos tóxicos agudos da aflatoxina. Nos humanos assume-se similaridade dos efeitos da micotoxina no organismo (FDA, 2015).

Diferentes espécies de animais respondem de maneira diferente quanto à susceptibilidade a intoxicação crônica ou aguda. A toxicidade da micotoxina pode ser influenciada por fatores ambientais, níveis e duração de exposição, idade, saúde e condições nutricionais de dieta (FDA, 2015).

Em aves, o acúmulo dessas toxinas está associadas a alta taxa de mortalidade, além de promoverem diversos efeitos tóxicos, incluindo alterações no sistema imunológico (EBRAHIMI; SHAHSAVANDI, 2008) e decréscimo na produção de ovos (EXARCHOS; GENTRY, 1982).

O limite máximo para a presença de aflatoxinas em milho não processado usado para consumo direto na alimentação humana ou como ingrediente em outros produtos alimentícios é de 5,0 $\mu g.kg^{-1}$ para aflatoxina B1 e 10,0 $\mu g.kg^{-1}$ para aflatoxinas totais (B_1, B_2, G_1 e G_2) (EU, 2006).

No Brasil, devido à alta toxicidade e contaminação de alimentos, as aflatoxinas são consideradas de maior importância. Essa toxina é encontrada principalmente no milho, amendoim, sementes de algodão e castanhas, sendo B_1, B_2, G_1 e G_2 mais comumente encontrada, com prevalência da toxina mais tóxica B_1 (LAZZARI, 1997; MALLMANN; DILKIN, 2007), como demonstra a Figura 1.

Outros cereais, tais como, sorgo, arroz, cevada e trigo são considerados menos susceptíveis a contaminação por essa micotoxina (GALVANO et al., 2005).

Os limites máximos tolerados (LMT) de aflatoxinas ($B_1 + B_2 + G_1 + G_2$) de grãos de milho e em farinhas estabelecidos pelo Ministério da Saúde – ANVISA, é de 20 $\mu g.kg^{-1}$ em alimentos destinados a consumo humano (ANVISA, 2011).

Em estudo para determinação de multi-toxinas em nove cervejas tradicionais baseadas em milho no Malawi, África Oriental, as aflatoxinas com exceção de uma amostra, foram encontradas em todas as amostras analisadas, com contaminação entre 90 a 95 $\mu g.kg^{-1}$ (MATUMBA, 2014).

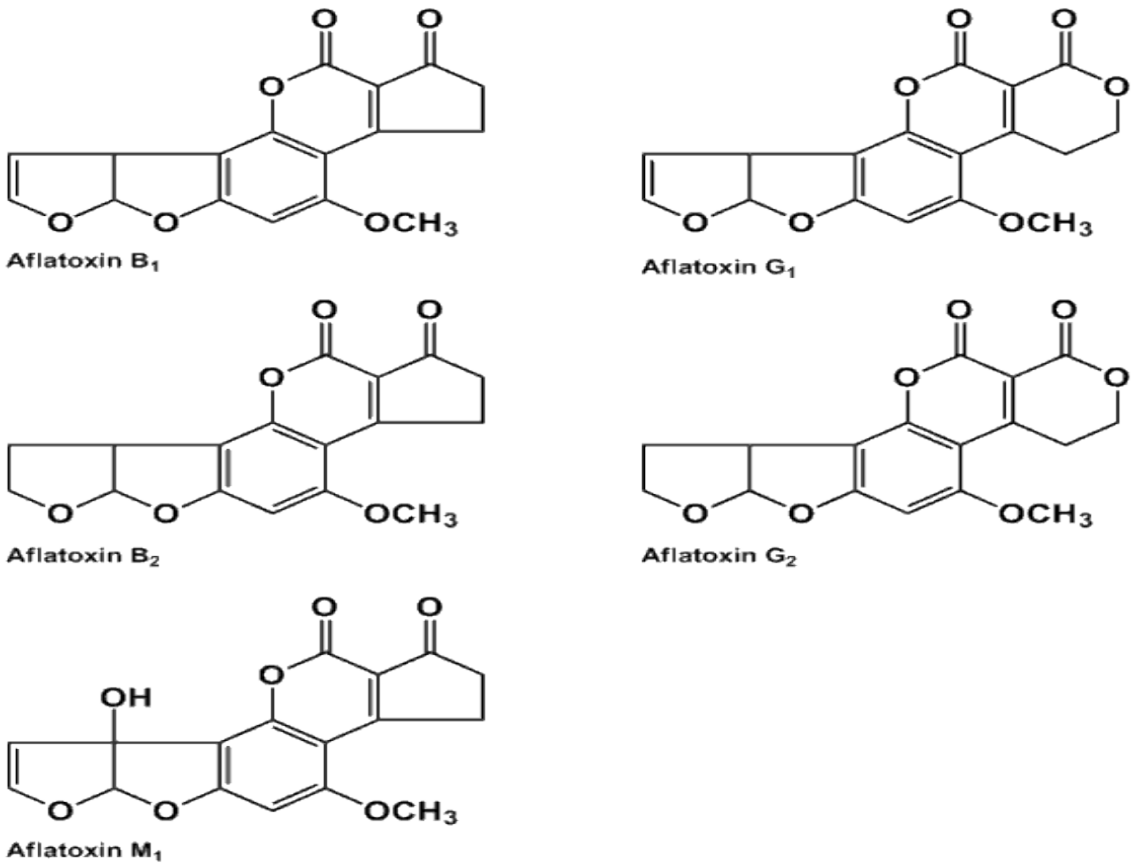

Figura 1 - Estrutura química das aflatoxinas B_1, B_2, G_1, G_2 e M_1
Fonte: U.S Food and Drug Administration - FDA

2.5.2 Fumonisinas

Fumonisinas são toxinas de ocorrência natural no ambiente, produzidas por fungos *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, e outras espécies de *Fusarium* que são comuns contaminantes naturais do milho, podendo ser produzidas em produtos agrícolas no campo ou durante o armazenamento. A descoberta se de por meio do isolamento de culturas do fungo *Fusarium verticillioides* MRC 826, após elevada incidência de cancro esofágico (EC) na região de Transkei na África do Sul (GELDERBLOM et al., 1988).

Entre as micotoxinas produzidas por *Fusarium* spp., as fumonisinas são consideradas as mais importantes devida à sua elevada incidência, níveis de produção e toxicidade (VOLKEL et al., 2011). Existem diferentes séries de fumonisinas, no entanto, a que se encontra em maior abundância é a FB_1, considerada mais tóxica, seguida da FB_2 e FB_3 (LABUDA et al., 2003). A maioria dos isolados de *Fusarium veticillioides* é capaz de produzir a micotoxina, produção máxima de fumonisinas em temperaturas próximas a 30 ºC (TANCIC et al., 2012; FANELLI et al., 2013).

Os níveis de fumonisinas em grãos de milho são influenciados por fatores ambientais, como temperatura e umidade de diferentes regiões geográficas, estresse hídrico, e precipitação durante os períodos de pré-colheita e de colheita. Níveis de fumonisina também são influenciados pelas condições de armazenamento (FDA, 2001).

As fumonisinas são micotoxinas citotóxicas e inibem a síntese proteica e do DNA, promovem estresse oxidativo, induzem a fragmentação do DNA e interrompem o ciclo celular (CREPPY et al., 2004). A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classificou as fuminisinas como prováveis carcinogênicos (IARC, 2002).

Na pecuária, a ingestão de milho contaminado com fumonisinas pode levar a sérias doenças em animais, como leucoencefalomalácia equina, podendo causar óbitos sob exposição à alta concentração da toxina (PRELUSKY et al., 1994), edemas pulmonares em suínos, redução do crescimento em aves domésticas e desordens imunes e hepáticas em bovinos (HARRISON et al., 1990; LOGRIECO et al., 2003; GIANITTI et al., 2011).

Fumonisinas também são diretamente relacionadas com câncer de esôfago em humanos e defeitos na formação do tubo neural em fetos (DOI; UETSUKA, 2011; VOLKEL et al., 2011).

A FB_1 é um diéster de propano-1,2,3-ácido tricarboxílico e 2S-amino-12-S,16R-dimetilo-3S,5R,10R,14S,15R-pentahidroxieicoisano, com formula estrutural representado na Figura 02.

O LMT de fumonisinas são de 4.000 $\mu g.kg^{-1}$ para milho não processado, 1.000 $\mu g.kg^{-1}$ em milho para consumo direto humano, 800 $\mu g.kg^{-1}$ em cereais matinais e lanches derivados de milho, 200 $\mu g.kg^{-1}$ para lactentes e crianças (EC, 2007).

No Brasil, os limites estabelecidos pela ANVISA RDC nº 07 são de 5000 $\mu g.kg^{-1}$ para as fumonisinas B_1 + B_2 em grãos de milho antes do processamento e de 2000 a 2500 $\mu g.kg^{-1}$ para produtos de milho processado. Porém o limite máximo tolerado será reduzido em janeiro de 2016 para 1000 e 1500 $\mu g.kg^{-1}$ para os produtos: como farinha, canjica e amido (ANVISA, 2011).

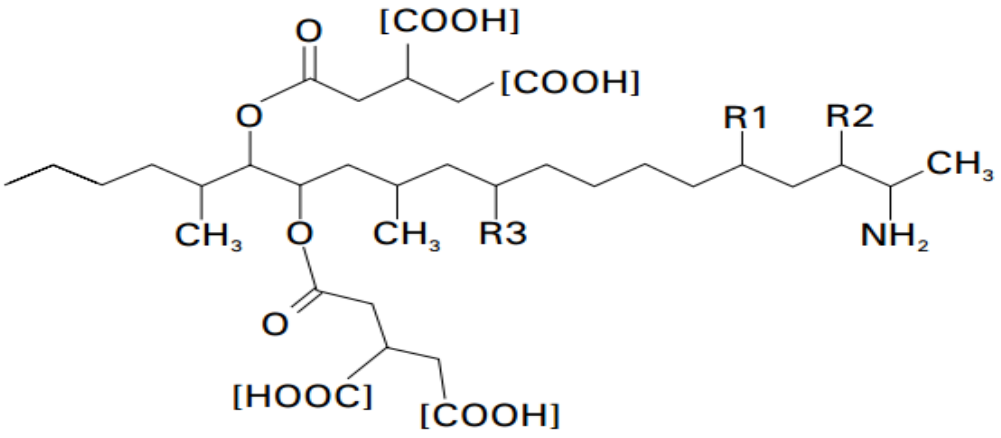

Figura 2 - Estrutura química da fumonisina
Fonte: U.S National Library of Medicine

As fumonisinas têm sido encontradas como contaminante de alimentos e rações à base de milho no EUA, China, Europa, África do Sul e América do Sul (MILLER, 1995; ARINO et al., 2009; REYES-VELAZQUES, 2011; WEI et al., 2013).

Santiago et al. (2013) avaliaram na Espanha o acúmulo de fumonisinas em diferentes genótipos de milho inoculados com *F. verticillioides*, e encontraram diferença significativa de resistência a contaminação nos diferentes genótipos de milho contaminados analisados.

Foram encontrados híbridos de milho naturalmente contaminados por *Fusarium* sp., no estado de Arkansas (EUA). A contaminação foi detectada em todas as amostras analisadas, com nível acima do limite de 2.000 $\mu g.kg^{-1}$ permitido pela agência reguladora (FDA) dos Estados Unidos da América (ABBAS et al., 2006).

A avaliação da contaminação de multi-toxinas em cervejas a base de milho no Malawi África Oriental, indicou a presença de fumonisinas em todas as amostras analisadas, com variação de 1.405 a 1.898 $\mu g.kg^{-1}$ para FB_1 + FB_2 + FB_3 (MATUMBA et al., 2014).

2.5.3 Zearalenona

Zearalenona (ZEA), (S- (E) - 3,4,5,6,8,10-hexa-hidro-14,16-di-hidroxi-3-metil-1H-2-benzoxacyclotetradecin-1,7(8H)–diona, é um metabólito secundário produzido por diversas espécies de *Fusarium*, incluindo *Fusarium graminearun*, *Fusarium culmorum, Fusarium crockwellense,* e *Fusarium sambucinum*. Cereais armazenados sob condições de elevada umidade podem resultar em altos níveis de contaminação por ZEA (Figura 3), sendo o milho o cereal com maior frequência de contaminação. Apesar disso, a contaminação por essa micotoxina tem sido relatada em grãos no campo, durante a colheita e grãos comercialmente processados (WEIDENBOMER, 2001).

No Brasil o LMT admitido pela legislação vigente para ZEA em milho em grão para posterior processamento é de 400 $\mu g.kg^{-1}$. Para subprodutos à base de milho é de 300 $\mu g.kg^{-1}$ até janeiro de 2016, que passará a ser de 150 $\mu g.kg^{-1}$ a partir dessa data. Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância) é de 20 $\mu g.kg^{-1}$.

A comissão da União Europeia estabelece como limite máximo de contaminação por ZEA em grãos de milho não processados 350 $\mu g.kg^{-1}$, de 100 $\mu g.kg^{-1}$

para milho utilizado em consumo direto para humanos e 20 µg.kg^{-1} em alimentos à base de milho para alimentação de lactentes e crianças de primeira infância (EU, 2007).

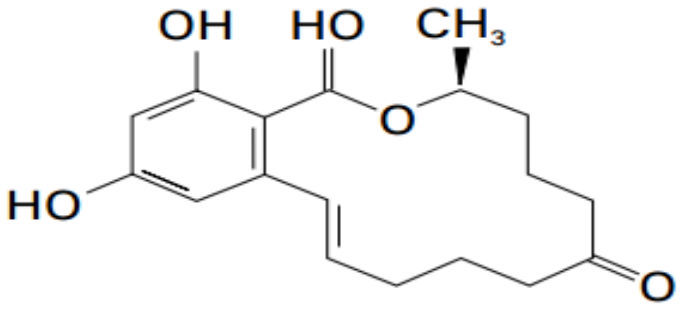

Figura 3 - Estrutura química da zearalenona

Fonte: U.S National Library of Medicine

A zearalenona mostra uma baixa toxicidade aguda e há poucas evidencias para sua carcinogenicidade baseada em estudos com animais. Entretanto, esta micotoxina apresenta devido ao seu efeito agonista no receptor de estrogênio, marcantes propriedades estrogênicas e anabólicas em várias espécies de animais, resultando em graves efeitos no sistema reprodutivo (JECFA, 1997; EC, 2000; GROMADZKA et al., 2008;).

A contaminação dos alimentos por esta micotoxina é causada de forma direta nos grãos, ou pela transição da micotoxina e seus metabólitos em tecidos animais, leite e ovos após a ingestão de ração contaminada (SZUETZ et al., 1997).

As proporções de concentração dos seus principais metabolitos (α-ZEA e β-ZEA) variam consideravelmente entre as espécies animais. Os suínos estão entre as espécies mais sensíveis, com uma predominância relatado do metabólito α-ZEA (MALEKINEJAD et al., 2005), enquanto que β-ZEA é mais prevalente em aves domésticas e ruminantes. O α-ZEA também tem sido descrito como mais frequente em humanos (VIDEMANN et al., 2008).

Estudos sobre os efeitos da zearalenona e seus metabólitos em humanos ainda não são muito frequentes, exceto por alguns estudos em pacientes com câncer (PILLAY et al., 2002) e com possível relação entre a exposição ambiental do

micoestrógeno e seus efeitos estrogênicos como fator de desenvolvimento de puberdade precoce e seus efeitos anabolizantes em meninas no período pré-puberdade (MASSART et al., 2008; MASSART e SAGGESE, 2010).

Molina et al. (2014), em observação sobre as atividades estrogênicas e anti-andrógenas da zearalenona e seus metabolitos, observaram que esses componentes podem interferir na desregulação do sistema endócrino de humanos e animais por várias formas de ação.

Frente ao exposto, com o levantamento e a caracterização dos fungos e micotoxinas presentes em grãos de milho armazenados nas cidades de Sorriso e Sinop no estado de Mato Grosso, espera-se obter dados que auxiliem no controle da qualidade sanitária dos grãos de acordo com os padrões previstos em legislação, garantindo segurança alimentar aos consumidores.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, H. K.; et al. **Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas.**USA. Crop Protection 25, 2006, pg 1-9.

ANDRADE, E. T.; et al. Qualidade de sementes de milho armazenadas em silo metálico cilíndrico. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v.28, n.2, p.23-30, jul./dez 2003.

ALMEIDA, A. P; et al. **Milho recém-colhido no Brasil**: Interação da microbiota fúngica, fatores abióticos e ocorrência de fumonisinas. Revista Instituto Adolfo Lutz, v. 64, n. 1, p.1-9, 2005.

ARINO, A. HERRERA, M.; et al. **Influence of agricultural practices on the contamination of maize by fumonisin mycotoxins.** Journal of Food Protection, 72, 898 e 902., 2009.

BEWLEY, J. D.; Black, M. **Seeds:** physiology of development and germination**.** 2 ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **RESOLUÇÃO** - RDC No-7, DE **18 DE FEVEREIRO DE 2011.**

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde**. Relatório Final do Grupo Interministerial frente ao Surto de Beribéri na região Sudoeste do Estado do Maranhão.** Brasília: Misnistério da Saúde; 2007a. 60p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Investigação de surto de bebibéri na região Sudoeste do Estado do Maranhão, junho de 2006.** Relatório Final. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2007b. 45.

BORUTOVA, R.; et al. **Co-occurrence and statistical correlations between mycotoxins in feedstuffs in the Asia-Oceania em 2010**. Herzogenburg, Austria. Animal Feed Science and Technology 178, 2012. p 190-197.

BROOKER, D. B.; BAKKER-ARKEMA, F. W.; HALL, C. W. **Drying and storage of grains and oilseeds**. Westport: The AVI Publishing Company, 1992.

CARVALHO, A. R. **Determinação da atividade de água (Aa) de produtos alimentícios no aparelho Novasina**. Campinas: CETEA/ITAL, 1997. 32p.

CAST. Council for Agricultural Science and Technology. **Mycotoxins: risk in plant and animal systems.**In task Force Report 139: CAST: AMES, IA, 2003, 199 p.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento - **Armazenagem agrícola no Brasil**. Brasília, 2013.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento**. Monitoramento Agrícola – Safra 2014/2015.** Brasília: Conab [on line]. Disponível em <http://www.conab.org.br>. Fevereiro, 2015.

CHRISTENSEN, C. M. **Microflora and seed deterioration**. In: Roberts, E. H. (Ed.). Viability of seeds. London, Chapman and Hall, 1974. p. 59-93.

CREPPY, E. E.; et al. **Toxicology,** 2004. pg *201*, 115.

DELOUCHE, J.C.; BASKIN, C.C. **Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots.** Seed Science and Technology , v.1, n.2, 1973.

DILKIN, P.; et al. **Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de aflatoxinas em híbridos de milho**. Ciência Rural, v. 30, n. 1, p. 137-141, 2000.

DOI, K., UETSUKA, K., 2011. **Mechanisms of mycotoxin-induced neurotoxicity through oxidative stress-associated pathways**. Int. J. Mol. Sci. 12, 5213-5237.

EBRAHIMI, M.M.; SHAHSAVANDI, S. **Evaluation of antibody levels during simultaneous aflatoxicosis and vaccination against infectious laryngotracheitis in pullets.** Biologicals, v.36, p.327-329, 2008.

EMBRAPA. **Micotoxinas**: importância na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 48p.

EUROPEAN COMMISSION. . Regulation (EC) **No 576/2006/EC, 2006Commission recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin** A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. Off. J. Eur. Union L229, 7–9, 2006.

EUROPEAN COMMISSION. Regulation (EC) **No 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation.** (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products. Off. J. Eur. Union L255, 14–17, 2007.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos.** 2. ed. São Paulo, Atheneu, 2008. 652 p.

EXARCHOS, C.C.; GENTRY, R.F. **Effect of aflatoxin B1 on egg production**. Avian Diseases, v.26, n.1, p.191-195, 1982.

FANCELLI, A. L. **Tecnologia da produção**. In: FANCELLI, A. L.; LIMA, U. A. ***Milho*:** produção, processamento e transformação industrial. São Paulo: Secretaria da Indústria e Comércio, Ciência e Tecnologia, 1983. p. 1-68.

FAO – **Food and Agriculture Organization of the United Nations** – Acesso em Março de 2015: http://www.fao.org/docrep/x5036e/x5036E04.HTM#An introduction to mycotoxins, 2012.

FAO – **Food and Agriculture Organization of the United Nations** – Acesso em Março de 2015: http://www.fao.org/docrep/x5036e/x5036E05.htm#Mycotoxins and human health risks an overview, 2012.

FAO. (2013). **Mycotoxins. Food Safety and Quality** - Acesso em: Março de 2015: http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-zindex/ mycotoxins/en/.

FAO-WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations-World Health Organization), 2001. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**. FAO Food and Nutrition Paper N 74.

FARIAS, A.X.; et al. Contaminação endógena do *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 3, p. 617-621, 2000.

FDA – Food and Drug Administration **Fumonisin levels in human foods and animal feeds**. Center for Food Safety and Applied Nutrition, Center for Veterinary Medicine [Federal Register, volume 66, Number 218]. USA. (2001).

FDA – Food and Drugs Administration - **ORA Lab Manual, Volume IV, Section 7-Mycotoxin Analysis**, 2013. 23 p.

FDA – Food and Drugs Administration – **Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins, Handbook: Aflatoxins.**Acesso em: Setembro de 2015: <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/ucm071020.htm>.

FERNÁNDEZ, A.; et al. **Aflatoxin and its metabolite residues in edible tissues from laying hens and broiler chickens fed a contaminated diet.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 65, n. 4, p. 407-414, 1994.

FORNASIERI, F. D. **Handbook of maize**. Jaboticabal: Funesp; 2007.

FRANCO, B. D. G. M. **Fatores intrínsecos e extrínsecos que controlam o desenvolvimento microbiano nos alimentos**. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 2008, Cap. 2, p. 13- 26.

GALVANO, F.; et al. Mycotoxins in the human food chain. In: DIAZ, D. E. **The Mycotoxin Blue Book**. Nottingham: Nottingham University Press. p. 187-224, 2005.

GELDERBLOM, W. C. A.; et al. *Appl. Environ. Microbiol.54*, 1806, **1988.**

GERMANI, R. **Protocolo de qualidade do milho**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos 23p. (Embrapa Agroindústria de Alimentos. Documentos, INSS 0103-6068; 59), 2004.

GIANNITTI, F., et al. **Equine leukoencephalomalacia (ELEM) due to fumonisins B1 and B2 in Argentina**. Pesq. Vet. Bras. 31, 407-412 p., 2011.

GROMADZKA, K., et al. **Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines.**World Mycotoxin J. 1, 209–220, 2008.

HARRISON, L.R., et al. **Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of Fusarium moniliforme**. J. Vet. Diagn. Investig. 2, 217-221., 1990.

HARVEY, R.B., et al. **Influence of aflatoxin and fumonisin B1-containing culture material on growing barrows**. Am. J. Vet. Res. 56, 1668–1672 p., 1995.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Censo Agropecuário** Disponível em http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/uf.php?lang=&coduf=51&search=mato-grosso=> Acessado em: Fevereiro de 2015.

INSTITUTO MATO-GROSSENSE DE ECONOMIA AGROPECUÁRIA – IMEA**. Estimativa de Safra de milho** – Agosto de 2014. Disponível em<http://www.imea.com.br/upload/publicacoes/arquivos/R403__7_Estimativa_de_safra_de_milho_2013-14__10_08_21.pdf>.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Summaries & Evaluations**, Fumonisin B1. 301 pp, 2002.

JECFA, 1997. Safety Evaluation of Certain Food Additives. **WHO Food Additives Series 44.** Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 53rd Report, Geneva, Switzerland.

JUAN, C.; et al. **Evaluation of beauvericin and enniatins in Italian cereal products and multicereal food by liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry**. Food Chemistry 140, 2013. 755-762 p.

KLICH, M.A. ; PITT, J.L. 1988. **Differentiation of Aspergillus flavus from A. parasiticus and other closely related species**. Trans. Br. Mycol. Soc. 91: 99-108.

KOBLITZ, M.G. B. **Matérias-Primas Alimentícias**. Composição e Controle de Qualidade. 1.ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2011. 288 p

LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações.** 2a Edição. Curitiba, Ed. do Autor, 140p, 1997.

LABUDA, R.; TANCINOVA, D.; HUDEC, K.; *Ann. Agric. Environ. Med.* , *10*, 61, **2003.**

LOGRIECO, A.; et al. **Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops**. Eur. J. Plant Pathol. 109, 645–667 p. , 2003.

LOPEZ-GARCIA, R., PARK, D.L., PHILLIPS, T.D., 1999. **Integrated mycotoxin management systems**. In: FAO (Ed.), Preventing Mycotoxin Contamination. FAO, Rome, pp. 38–47 (FAO Food Nutrition Paper No. 23).

MALEKINEJAD, H., MAAS-BAKKER, R.F., FINK-GREMMELS, J**. Bioactivation of zearalenone by porcine hepatic biotransformation**. Vet. Res. 36, 799–810, 2005.

MALLMANN, Carlos Algusto; DILKIN, Paulo. **Micotoxinas e micotoxicoses em suínos.** Santa Maria: Editora Sociedade Vicente Palloti, 2007.

MATUMBA, L.; et al. **A limited survey of mycotoxins in traditional maize based opaque beers in Malawi**. Malawi, Food Control 36, 253-256p, 2014.

MASSART, F., SAGGESE, G.. **Oestrogenic mycotoxin exposures and precocious pubertal development**. Int. J. Androl. 33, 369–376, 2010.

MILLER, J. D. **Fungi and mycotoxins in gain: implications for stored product research**. J. STORED PROD. RES,. v. 31, n. 1, p. 1-16, 1995.

MOLINA, J. M. M; et al. **Assessment of estrogenci and anti-androgenic activities of the mycotoxin zearalenone and its metabolites using in vitro receptor-specific bioassays.** Food and Chemical Toxicology, 74, 2014. 233-239 p.

NASCIMENTO, V. R. G. et al**. Desempenho de estratégias de aeração de milho armazenado: Fungos e condutividade elétrica**.Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. Campina Grande, v.16, n.1, p.113–121 PB, UAEA/UFCG. 2012.

PAES. D. M. C. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica. 2006. 6p.

PIMENTEL, M. A. G; FONSECA, M. J. O. **Cultivo do Milho: Secagem e Armazenagem.** Embrapa Milho e Sorgo Sistema de Produção, (ISSN 1679-012X Versão Eletrônica). 7ªed, 2011.

PILLAY, D., et al. **The quantitative analysis of zearalenone and its derivatives in plasma of patients with breast and cervical cancer**. Clin. Chem. Lab. Med. 40, 946–951. 2002.

PINTO, N. F. J. A. **Grãos ardidos em milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo,. 6 p. (Circular técnica, 66)., 2005.

PITT, J. I. **Toxigenic fungi:** which are important. Medical Micology, Oxford, v. 38, p. 17-22, 2000.

PLACINTA, C. M., D'MELLO, J. P. F., MAcDONALD, A. M. C**. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins**. Animal Feed Science and Technology, 78, 21–37, 1999.

PRANDINI, A., et al. 2009. **On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products**. Food Chem. Toxicol. 47, 984–991

PRELUSKY, D.B., ROTTER, B.A. & ROTTER, R.G. **Toxicology of mycotoxins**. In: Miller, J.D. & Trenholm, H.L. (eds). Mycotoxins in grains. St Paul. Minnesota. Eagan Press. 1994. pp.359–404.

PUZZI, D. **Abastecimento e armazenamento de grãos.** Campinas: Ed. Atualizada. Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 2000.

QUEIROZ, V. A. V; et al. **Boas práticas e sistema APPCC na fase de pós-colheita de milho.** Circular Técnica 122. EMBRAPA. Sete Lagoas, MG. Dezembro, 2009, 28 p.

RESENDE, O.; et al. Comportamento mecânico dos grãos de feijão submetidos a compressão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, p. 404-409, 2007.

REYES-VELAZQUEZ, W. P., et al. **Fusarium species (section Liseola) occurrence and natural incidence of beauvericin, fusaproliferin and fumonisins in maize hybrids harvested in Mexico**. Mycotoxin Research, 27, 187e194., 2011.

RIBEIRO, D. M; et al. **Análise da variação das propriedades físicas dos grãos de soja durante o processo de secagem.** Ciênc. Tecnol. vol.25 no.3 Campinas, Julho/Setembro, 2005.

SANTIAGO, R.; et al. **Assessment of corn resistence to fumonisin accumulation in broad collection of inbred lines**. Field Crops Research, Pontevedra, Spain. 2013. p 193-202.

SARGENT, K.; CARNAHAN, R. B. A.; ALLCROFT, R. **Toxic products in groundnuts - chemistry and origin**. Chemy Ind. 1963: p 55-61.

SCF Scientific Committee on Food, Opinion of the Scientific Committee on Food on **Fusarium toxins**. Parts 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol, adopted on 26 February 2002, SCF/CS/CNTM/MYC/27 Final., 2002.

SILVA, J. S.; CORREA, P. C.; **Estrutura, composição e propriedades físicas dos grãos.** Capítulo 2, p. 21, 2000.

SILVA, J. S. **Secagem e armazenagem de produtos agrícolas.** Editora Aprenda Fácil. Viçosa- MG. 2008. p. 34-53.

SILVA, L. C. **Estruturas para Armazenagem a Granel.** UFES – Universidade Federal do Espírito Santo,Departamento de Engenharia Rural. Boletim Técnico: AG: 2010.

SINDIRAÇÕES – **Setor de alimentação animal.** Disponível em: http://sindiracoes.org.br/wp-content/uploads/2014/12/boletim-informativo-do-setor_dezembro_2014_vs_portugues_final-site_baixa-10122014.pdf.

SZUETZ, P., et al. **Early telearche symptoms in children and their reaction to zearalenone contamination in food stuffs.** Cereal Research Communications 25, 429–436., 1997.

TANCIC, S., et al. **Diversity of Fusarium verticillioides and F. proliferatum isolates according to their fumonisin B1 production potencial and origin.**Genetika-Belgrade 44, 163–176p., 2012.

TANIWAKI, M. H; SILVA, N. **Fungos em Alimentos:** Ocorrência e Detecção. Campinas: Núcleo de Microbiologia/ITAL. 2001. 82 p.

USDA – United States Department of Agriculture – **Grain Fungal Diseases and Mycotoxin Reference.** Washington, D.C., 2006.

VAN EGMOND, H.P. **Mycotoxins in dairy products**. Elsevier Applied Science, London (UK), pp. 272., 1989.

VIDEMANN, B., et al. **Metabolism and transfer of the mycotoxin zearalenone in human intestinal** Caco-2 cells. Food Chem. Toxicol. 46, 3279–3286., 2008.

VOLKEL, I., SCHROER-MERKER, E., CLAUS-PETER, C. **The carry-over of mycotoxins in products of animal origin with special regard to its implications for the european food safety legislation.** Food Nutr. Sci. 2., 2011.

WEI, T., et al. **Natural occurrence of fumonisins B1 and B2 in corn in four provinces of China**. Food Additives & Contaminants: Part B, 6, 270e274, 2013.

CAPÍTULO 2: IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FUNGOS E MICOTOXINAS EM GRÃOS DE MILHO ARMAZENADOS NA REGIÃO MÉDIO NORTE DE MATO GROSSO/BRASIL.

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FUNGOS E MICOTOXINAS EM GRÃOS DE MILHO ARMAZENADOS NA REGIÃO MÉDIO NORTE DE MATO GROSSO/BRASIL.

REVISTA *SEGURANÇA ALIMENTAR E NUTRICIONAL*

André Luiz Arenhardt[1,3]; Gilma Silva Chitarra [1]; Solenir Ruffato [2]; Solange Maria Bonaldo [2].

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso[1], *Campus* Cuiabá Bela Vista, Cuiabá/MT – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, IFMT/*Campus* Bela Vista.

Universidade Federal de Mato Grosso[2], *Campus* Sinop, Sinop/MT - Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, UFMT/*Campus* Sinop.

André Luiz Arenhardt, Rua das Rosas nº 390, Jardim Europa, Sorriso/MT.

(66) 9901-0490; FAX (66) 3544-4278

E.mail: andrearenhardt@hotmail.com

Agência de fomento: FAPEMAT/CAPES-FAPEMAT [3], processo Nº. 163671/2014

TERMOS DE INDEXAÇÃO: ARMAZENAMENTO, CONTROLE DE QUALIDADE, SEGURANÇA ALIMENTAR, *ZEA MAYS* L.

RESUMO

O milho é uma das principais culturas plantadas no Brasil e no mundo. Por ser matéria-prima constituinte de uma variedade de produtos, ganha destaque no cenário agroindustrial devido a sua importância econômica e nutricional. Utilizado tanto de forma *in natura* na alimentação humana e animal, como em complexos agroindustriais, farinhas, óleos e rações industrializadas. Perdas significantes durante o período de armazenamento ainda são registradas, resultantes do ataque de insetos, fungos e roedores. Durante o período de armazenamento pode ocorrer o desenvolvimento de fungos nos grãos causando a perda de peso/descoloração e produção de micotoxinas, o qual representa um problema de saúde pública. Objetivou-se com este estudo detectar a contaminação por fungos e micotoxinas em grãos de milho armazenados nos municípios de Sorriso e Sinop/MT. Foram coletados grãos de milho em unidades armazenadoras localizadas em Sorriso (9) e Sinop (3), da safra 2014. Foram realizados, o teste de sanidade, “Blotter test”; teor de água; atividade de água e detecção de micotoxinas nos grãos de milho armazenados coletados. A identificação dos fungos foi feita com o auxílio dos microscópios estereoscópio e composto. A ocorrência dos fungos associados aos grãos, (média %), com e sem desinfestação, foram: *Fusarium* sp. (89 e 30), *Penicillium* sp. (70 e 0,5), *Cladosporium* sp. (61 e 0,5), *Aspergillus* sp. (50 e 1,7), *Rhizopus* sp. (16 e 0,1) e *Nigrospora* sp. (0 e 0,5), respectivamente. O teor de água dos grãos variou entre 6,43 a 10,60 % e a atividade de água variou entre 0,32 a 0,61. A micotoxina fumonisina foi detectada em 100% das amostras, com variação da concentração entre 2.829 e 23.630 $\mu g.kg^{-1}$. A aflatoxina foi detectada em 60% das amostras com variação da concentração de 1,31 a 3,40 $\mu g.kg^{-1}$. A zearalenona não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas. Conclui-se que a micotoxina fumonisina produzida pelo fungo do gênero *Fusarium* sp., com alta ocorrência nesta pesquisa, potencialmente toxigênicos, apresenta amostras com concentração fora do limite tolerado pela legislação vigente, sugerindo que o consumo desse produto pode causar problema de saúde. Estudos devem ser desenvolvidos para o controle do *Fusarium* sp. e prevenção de produção de fumonisinas.

Palavras-chave: Armazenamento, Controle de Qualidade, Segurança Alimentar, Z*ea mays* L.
Agência Fomento: FAPEMAT - processo Nº. 163671/2014
Bolsa de Estudos: CAPES/FAPEMAT

ABSTRACT

Maize is the most important crop grown in Brazil and in the world. Being constituent raw material of a variety of products, is highlighted in the agro-industrial setting due to their economic and nutritional importance. Maize is used *in natura* in food and feed, as in agroindustrial complex, flour, oils and industrialized rations. Significant loss during the storage period is still registered resulting from the attack of insects, fungi and rodents. During the storage period may occur in the development of fungi grains causing weight loss / discoloration and mycotoxin production, which is a public health problem. This research aimed at the detection of fungi and mycotoxins in corn grain stored in the cities of Sinop and Sorriso / MT. Were collected maize grains in storage units located in Sorriso (9) and Sinop (3) of the crop 2014. Sanity tests or the "Blotter test" were conducted, analysis of water content, water activity and micotoxins detections to stored grains of corn. The identification of fungi was carried out with the aid of a stereoscope and optical microscope. The occurrence of fungi related to the grains was: mean (%) with and without disinfection, *Fusarium* sp. (89 and 30), *Penicillium* sp. (70 and 0.5), *Cladosporium* sp. (61 and 0.5), *Aspergillus* sp. (50 and 1.7), *Rhizopus* sp. (16 and 0,1) and *Nigrospora* sp. (0 to 0.5), respectively. The water content ranged from 0,63 to 10,60 %. and water activity ranged from 0,32 to 0,61. Fumonisin was detected in 100% of the samples with varying concentration of between 2.829 and 23.630 $\mu g.kg^{-1}$. Aflatoxin was detected in 60% of samples ranging in concentration from 1.31 to 3.40 $\mu g.kg^{-1}$. Zearalenone has been detected in any sample analyzed. We conclude that the mycotoxin fumonisin produced by the fungus *Fusarium* sp., with high incidence in this study, potentially toxigenic presents samples with concentrations above the limit tolerated, suggesting that the consumption of this product may cause health problems. Studies should be developed for the control of *Fusarium* sp and fumonisin production prevention.

Keywords: Control Quality, Food Safety, Storage, *Zea mays* L.
Promotion agency: FAPEMAT - process Nº. 163671/2014
Scholarship: CAPES/FAPEMAT

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays L.*) é uma das principais culturas agrícolas destinadas à alimentação humana e animal devido à sua composição química e ao seu alto valor nutricional [1]. A importância econômica da cultura do milho é caracterizada pelas diversas formas de sua utilização, constituindo-se em indispensável matéria-prima para diversificados complexos agroindustriais, podendo ser utilizado como componente básico na alimentação humana, de forma *in natura* ou como farinhas, óleo, amido e também na alimentação animal direto ou em rações industrializadas, sendo absorvida grande parte da produção dos grãos para fabricação de rações animais [2].

O Brasil é um dos maiores produtores de milho do mundo e o estado de Mato Grosso representa o maior produtor desse cereal no Brasil, com uma área de aproximadamente 3,2 milhões de hectares plantados na safra 2014 [3]. No entanto, a cadeia produtiva do milho enfrenta dificuldades referentes à qualidade do milho e à carência na infraestrutura do sistema de armazenagem.

A qualidade do milho utilizado como matéria prima é essencial para a obtenção de produtos de qualidade produzidos por processos industriais, seja para a alimentação animal ou humana. A qualidade pode ser afetada durante todas as fases de produção da cultura, desde os processos de colheita até o armazenamento. Na etapa de armazenamento a qualidade dos grãos é preservada por um período maior de tempo sem que haja deterioração, visando atender à crescente demanda de alimentos sem comprometer a segurança alimentar dos consumidores.

As condições de armazenamento, como temperatura, umidade e aeração, muitas vezes inadequadas, e a capacidade estática, limite máximo nominal de carga que uma área pode receber simultaneamente, para suprir a demanda devido à alta produção da cultura no estado de Mato Grosso, geram problemas dentro da cadeia produtiva do milho.

Outro entrave durante o período de armazenamento é a associação de fungos aos grãos, pois alguns desses fungos além de causarem deterioração, podem ser potenciais produtores de micotoxinas, principalmente pelos gêneros *Aspergillus,*

Fusarium e Penicillium, podendo desenvolver e produzir substâncias tóxicas consumidores [4].

As micotoxinas, metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos, são substâncias químicas tóxicas ao homem e aos animais, mesmo se ingerido em pequenas concentrações [5]. Esses compostos podem produzir efeitos tóxicos agudos, carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos e estrogênicos em humanos e animais, dependendo do nível de exposição [6].

O monitoramento da qualidade fitossanitária dos grãos de milho armazenados e a determinação das micotoxinas servem para determinar o padrão de qualidade dos grãos produzidos e armazenados, utilizados nas indústrias para a produção de alimentos destinados aos animais e humanos [7]. Essas informações auxiliam na decisão da utilização ou no descarte da matéria-prima quando estão abaixo dos padrões estabelecidos pela legislação vigente.

O Médio-Norte do estado de Mato Grosso é considerado uma importante região produtora devida a sua grande produção de grãos. O conhecimento sobre as condições dos grãos produzidos na região auxiliam no controle da qualidade sanitária dos grãos da região, garantindo maior segurança alimentar aos consumidores e valor de comercialização do produto aos produtores.

A utilização de grãos de milho contaminados com fungos, com a presença de micotoxinas, pela contaminação direta ou indireta, expõe a população a sérios riscos de doenças alimentares, podendo causar intoxicações agudas e crônicas em humanos e animais [7].

Diante do exposto, teve-se por objetivo realizar a identificação e caracterização de fungos e micotoxinas associados aos grãos de milho durante o período de armazenamento na região de Sorriso e Sinop no estado de Mato Grosso.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do estudo

A caracterização dos fungos e preparo para analise de micotoxinas foram realizados no Laboratório de Microbiologia/Fitopatologia e no laboratório de Pós-colheita de Grãos da Universidade Federal de Mato Grosso – *Campus* Sinop. As amostras dos grãos de milho (*Zea mays*) foram obtidas em unidades de armazenamento de grãos da safra de 2014. Foram analisadas amostras provenientes de doze unidades armazenadoras de grãos, situadas no município de Sorriso (nove unidades) e no município de Sinop (três unidades).

2.2 Condições ambientais da região

Os valores de temperatura (ºC), umidade relativa do ar (%) e precipitação diária (mm) durante o período das coletas e armazenamento dos grãos de milho foram obtidos da Estação Meteorológica da Universidade Federal de Mato Grosso/Sinop, localizado em 11º 51’ 0,8’’ S e 555º 30’ 56’’ e altitude média de 371 m. A estação é equipada com sistema de aquisição de dados CR 1000 da Campbell Scientific. Os dados utilizados nesta pesquisa, obtidos de forma automática e diariamente a cada 5 minutos, sendo posteriormente, obtidos os valores totais, médios, compreendem o intervalo do início ao termino do período de coleta das amostras de grãos de milho realizados nas unidades armazenadoras da região de Sorriso e Sinop/MT.

2.3 Coleta e preparo das amostras

Amostras simples de grãos foram coletadas em dez diferentes pontos dos armazéns, formando uma amostra composta de 4 kg. As amostras foram homogeneizadas manualmente, quarteadas, resultando em uma amostra de 2 kg que, posteriormente, foi acondicionada em sacos de algodão e encaminhada ao laboratório de Pós-colheita de Grãos e ao laboratório de Microbiologia/Fitopatologia da Universidade Federal de Mato Grosso – *Campus* Sinop. Foram realizadas três coletas por unidade de armazenamento, com início em julho e término em dezembro, com intervalo de aproximadamente 2 meses entre as coletas, por um período de 6 meses,

totalizando 36 amostras simples de grãos de milho. As unidades armazenadoras foram selecionadas a partir da disponibilidade das empresas em participar do estudo.

2.4 Determinação do teor de água

A determinação do teor de água dos grãos foi realizada pelo método direto, em estufa com circulação forçada de ar, a 105 ºC por 24 horas, conforme metodologia descrita nas Regras de Análises de Sementes [8].

2.5 Determinação da atividade de água (Aa)

Para a determinação da atividade de água, foi utilizada para cada amostra uma subamostra de 50 g de grãos de milho, em aparelho analisador de atividade de água da marca NOVASINA – modelo LABMASTER – AW, com tempo de analise médio de 12 minutos para cada amostra.

2.6 Detecção e identificação da microbiota fúngica

A detecção dos fungos associados aos grãos de milho coletados nas unidades de armazenamento foi determinada pelo teste de sanidade, “Blotter test” [9], modificado com restrição hídrica [10]. Para a realização do teste, foram utilizados 400 grãos por amostra. O teste consistiu em dispor os grãos, de forma equidistante, em placas de Petri de 15 cm de diâmetro (25 grãos/placa) contendo três folhas de papel de filtro, previamente esterilizados, e umedecidas com solução osmótica de NaCl -0,8 MPa, totalizando 16 placas por amostra. Para cada amostra, foi realizado o teste de sanidade sem desinfestação e com desinfestação. Para desinfestação, os grãos ficaram imersos em álcool 70% por 1 minuto. Posteriormente foram imersos em solução de hipoclorito de sódio a 2%, por 1 minuto e lavados em seguida com água destilada esterilizada. No teste sem desinfestação as amostras não sofreram tratamento prévio. As placas contendo os grãos de milho foram dispostas em câmara de incubação a 20 ± 2 ºC e fotoperíodo de 12 horas, durante 7 dias. Após o período de incubação, foi realizada a identificação dos fungos presentes nos grãos com o auxílio de microscópio estereoscópio e microscópio óptico.

2.7 Detecção e quantificação de micotoxinas

Para a realização da detecção e quantificação das micotoxinas presentes nos grãos foi efetuada a mistura dos grãos de milho das três coletas realizadas, para cada unidade, resultando em doze amostras, identificadas de A a L, pesando 4 kg cada amostra. A escolha das micotoxinas para realização das analises micotoxixológicas foi determinadas pela alta incidência dos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* [5].

2.7.1 Aflatoxinas

Para determinação e quantificação ($\mu g.kg^{-1}$) das aflatoxinas (B_1, B_2, G_1 e G_2), foi utilizada a metodologia descrita em AOAC 991.31 [11], por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com detector de fluorescência, acrescidos de técnicas próprias da empresa JLA Alimentos, responsável pelas análises.

2.7.2 Fumonisinas

Para determinação e quantificação ($\mu g.kg^{-1}$) das fumonisinas (B_1 e B_2), foi utilizada a metodologia descrita em AOAC 995.15 [11], por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acrescidos de técnicas próprias da empresa JLA Alimentos, responsável pelas análises.

2.7.3 Zearalenona

Para determinação e quantificação ($\mu g.kg^{-1}$) da zearalenona, foi utilizada a metodologia descrita em AOAC 985.18 [11], por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acrescidas de técnicas próprias da empresa JLA Alimentos, responsável pelas análises.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Condições ambientais da região

As condições ambientais da região (temperatura e umidade relativa do ar) durante os períodos de coletas dos grãos de milho armazenados são apresentadas na Figura 1.

Durante o período entre a primeira coleta (05/07/2014) e o período da terceira coleta dos grãos de milho armazenados (17/12/2014), houve um aumento da umidade relativa do ar. Essa variação ocorreu em função do início do período de chuvas na região que se deu no início de setembro. O tempo para realização de cada coleta nas doze unidades foi de até cinco dias.

No período entre a primeira coleta e o período da segunda coleta dos grãos armazenados, não houve precipitação, mantendo a umidade relativa do ar em valores próximos de 60%. Entretanto, com o início do período de chuvas, nota-se um aumento dos valores de umidade relativa do ar, mantendo sua média acima de 70%, possibilitando o reumedecimento dos grãos (Figura 1) em virtude do processo de aeração [4].

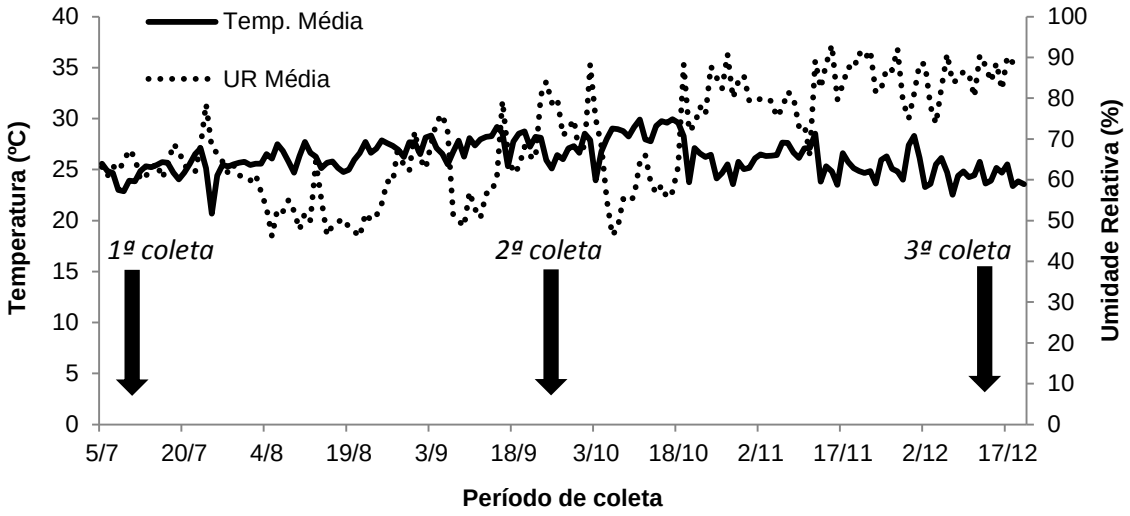

Figura 1 - Temperatura e umidade relativa do ambiente durante os períodos de coletas dos grãos de milho armazenados.
Fonte: Estação meteorológica da UFMT/Sinop.

Com o início do período chuvoso (Figura 2) e, consequentemente o aumento da umidade relativa do ar, a disponibilidade de água é maior, propiciando condições mais favoráveis para o desenvolvimento dos fungos e consequentemente comprometendo a qualidade dos grãos [12].

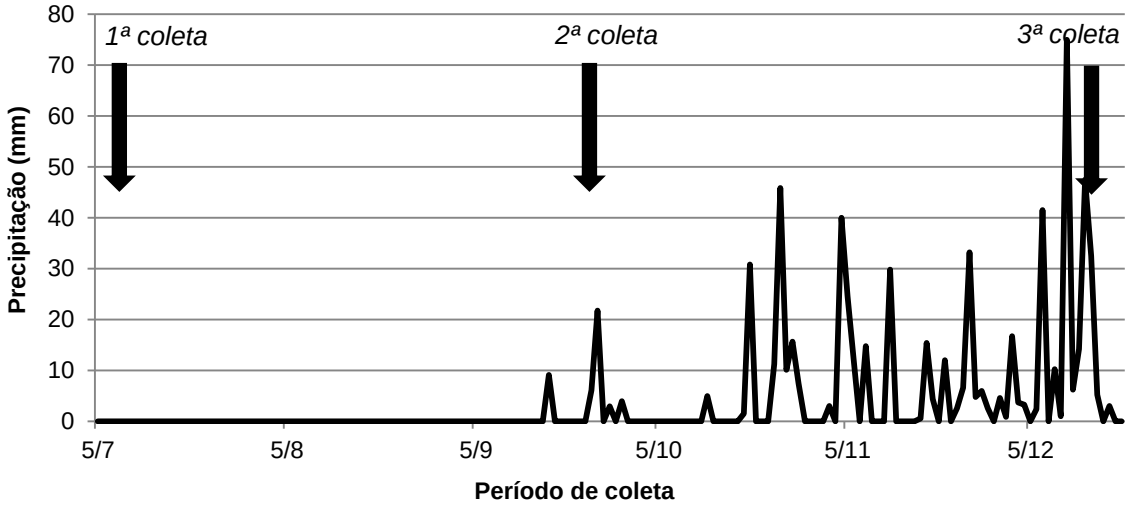

Figura 2 - Precipitação diária (mm) durante os períodos de coletas dos grãos de milho armazenados na região de Sorriso e Sinop/MT, 2014.
Fonte: Estação meteorológica da UFMT/Sinop

3.2 Determinação do teor de água dos grãos

A variação dos valores do teor de água dos grãos de milho (Tabela 1) foi de 6,72 a 10,00% na 1ª coleta; de 6,42 a 9,80% na 2ª coleta e, de 7,14 a 10,60% na 3ª coleta. Os valores médios do teor de água dos grãos nas três coletas foram de 8,08%, de 8,81% e de 9,48%, respectivamente. Os resultados indicam que as amostras de milho coletadas apresentaram umidade inferior à oficial admitida para a comercialização que é de até 14,0% [13].

Os valores do teor de água encontrados nas amostras obtidas pelo presente estudo são compatíveis com os recomendados para um armazenamento seguro de grãos de milho. Grãos armazenados com teor de água na faixa entre 13 e 14%, não apresentam risco de deterioração por até um ano de armazenamento e teores abaixo de 12% indica que não apresentam risco de deterioração por um período superior a um ano [12].

Tabela 1 - Teor de água dos grãos de milho armazenados obtidos nas três coletas das unidades armazenadoras, localizadas nas cidades de Sorriso e Sinop/MT.

Unidade	Teor de água (%)			
	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	Média
A	7,80	6,91	8,73	7,81
B	8,02	8,75	10,15	8,97
C	8,13	8,87	8,10	8,36
D	8,93	9,43	9,58	9,31
E	7,88	8,55	9,68	8,70
F	7,52	9,57	7,14	8,07
G	10,00	9,12	10,60	9,90
H	9,57	9,57	9,56	9,56
I	9,39	9,80	9,74	9,64
J	8,76	6,42	8,83	8,00
K	6,72	6,60	9,40	7,57
L	7,11	8,56	7,24	7,63
	Julho	**Setembro/Outubro**	**Dezembro**	

A variação do teor de água estimada entre as coletas pode ser explicada pela curva de umidade de equilíbrio (Figura 3). O produto armazenado é submetido ao processo de aeração (passagem do ar através da massa de grãos). O processo de aeração depende das condições ambientais devido à umidade relativa presente no ar. Quando a umidade do ambiente é alterada, o grão tende a entrar em equilíbrio com as condições do ar ambiente. A umidade de equilíbrio dos grãos depende ou é função da temperatura, da umidade relativa do ar e das condições físicas do grão [4].

No estado da Bahia, um experimento sobre a qualidade de grãos de milho armazenado comprovou que teores de água inferiores a 14% são seguros para a armazenagem, pois desfavorecem o crescimento fúngico e produção de micotoxinas [14].

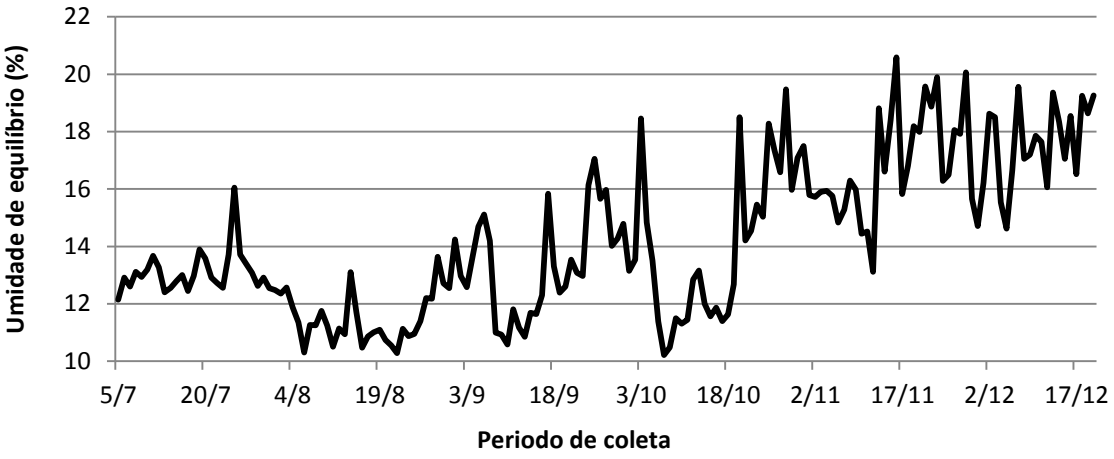

Figura 3 - Curva de umidade de equilíbrio das amostras de grãos de milho coletados nas unidades armazenadoras das cidades de Sorriso e Sinop/MT, 2014.
Fonte: Estação meteorológica da UFMT/Sinop.

3.3 Atividade de água (Aa) dos grãos

Os valores de Aa (decimal) das amostras de milho armazenado, coletadas nas unidades armazenadoras estão descritos na tabela 2. Os valores variaram entre 0,32 e 0,48, 0,36 e 0,50, e 0,47 e 0,61 para primeira, segunda e terceira coletas, respectivamente. A média da Aa foi de 0,43, 0,45 e 0,53 para primeira, segunda e terceira coleta, respectivamente.

Sugere-se que quando o grão possuir 13% de teor de água a atividade de água (Aa) se estabiliza, inviabilizando principalmente o desenvolvimento de fungos [15]. Para se desenvolverem os fungos necessitam de valores de Aa que variam de 0,65 a 0,90, dentro dessa faixa, o teor de água da massa de grãos pode variar de 14 a 28% [16].

Apesar das amostras de milho analisado neste trabalho estar abaixo desses valores, foi constatado crescimento de fungos em todas as amostras analisadas. O crescimento de fungos em condições de teor de água superiores aos descritos como seguros podem acelerar os processos deteriorativos dos grãos.

Tabela 2 - Valores de atividade de água (Aa) nos grãos de milho armazenados obtidas nas três coletas, nas unidades de armazenamento das cidades de Sorriso (A a I) e Sinop (J a L), MT, 2014.

Unidade	Atividade de água (Aa), decimal			
	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	Média
A	0,43	0,36	0,59	0,46
B	0,44	0,45	0,56	0,48
C	0,42	0,45	0,52	0,46
D	0,41	0,49	0,56	0,48
E	0,45	0,42	0,61	0,49
F	0,44	0,49	0,52	0,48
G	0,48	0,48	0,52	0,49
H	0,32	0,49	0,51	0,44
I	0,48	0,50	0,52	0,50
J	0,48	0,37	0,55	0,46
K	0,39	0,37	0,54	0,43
L	0,40	0,46	0,47	0,44

3.4 Qualidade sanitária dos grãos de milho armazenados

A incidência dos fungos associados aos grãos de milho coletados nas unidades de armazenamento, submetidos ao teste de sanidade, sem desinfestação, provenientes das cidades de Sorriso e Sinop, obtidos em três coletas, é apresentada na Figura 4.

No presente estudo foram detectados, no nível de gênero, pelo teste de sanidade sem desinfestação, os fungos *Fusarium* sp. *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. *Cladosporium* sp. e *Rhizopus* sp.

O gênero *Fusarium* foi detectado em todas as amostras analisadas, com variação de 92 a 100%, de 83 a 92% e, 75 a 83% de incidência para 1ª, 2ª e 3ª coletas, respectivamente. A média de infestação do *Fusarium* sp. foi de 88,88% para as três coletas.

No presente trabalho, foi verificado a redução da incidência do fungo *Fusarium* sp. no decorrer do período de armazenamento, possivelmente decorrido pela redução do teor de umidade, empregado durante a secagem dos grãos e redução da temperatura devido ao armazenamento. As amostras apresentaram incidência média de 88,88% do fungo *Fusarium* sp., e é possível que a contaminação tenha ocorrido ainda no campo.

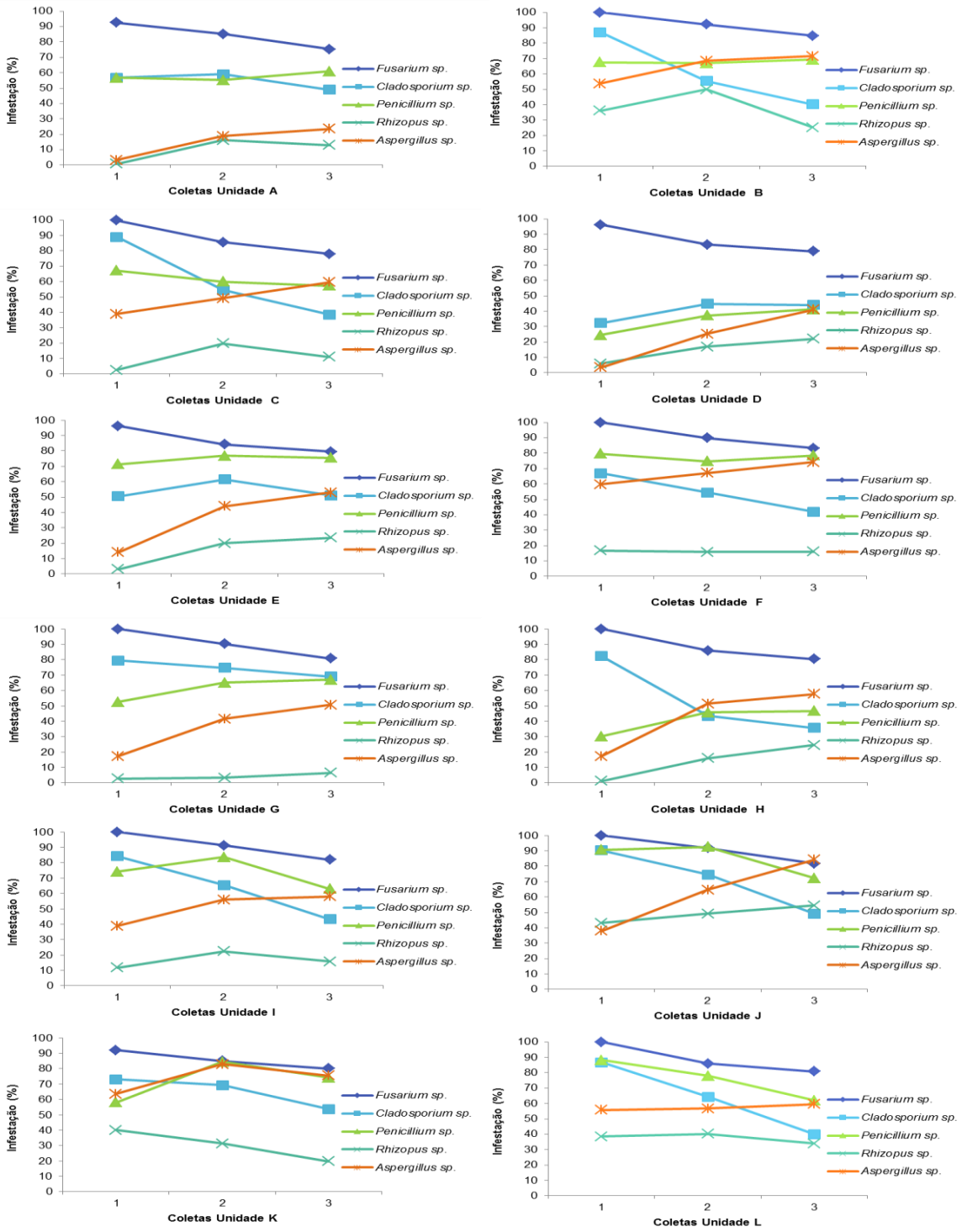

Figura 4 – Incidência média de fungos associados aos grãos de milho armazenados, por coleta realizada, submetidos ao ”blotter test” sem desinfestação, nas unidades armazenadoras das cidades de Sorriso e Sinop/MT, safra 2014.

Em estudo realizado com grãos de milho armazenados nas regiões do estado de Mato Grosso, nas safras 2009 e 2010, a incidência de *Fusarium* sp. na safra de 2009, com infestação entre 20 a 60% das amostras, foi inferior aos dados desta pesquisa, assim como na safra de 2010, com infestação de 60 a 100% das amostras. No entanto, apresenta maior incidência por este gênero se comparados a outros fungos identificados no mesmo estudo [17].

Os fungos sobrevivem associados às sementes de milho durante um período de 12 meses de armazenamento, em câmara fria e em ambiente sem controle de umidade e temperatura. Em estudo realizado no estado de São Paulo, observou-se maior incidência dos fungos dos gêneros *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., além de *Rhizopus* sp. Ao longo do período do armazenamento, principalmente em ambiente não controlado, a sobrevivência do fungo *Fusarium verticillioides* decresceu. Sugere-se que o decréscimo ocorra pelo fato desse fungo ser considerado de campo, onde as condições ambientais (umidade e temperatura) são ótimas para o desenvolvimento do patógeno e se diferem no armazenamento, ocorrendo condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento. Embora haja redução da incidência do *Fusarium verticillioides* durante o armazenamento, a presença desse fungo pode acelerar o processo de deterioração das sementes/grãos [18].

Em trabalho realizado para avaliar a incidência de patógenos em grãos de milho, no estado de São Paulo, o fungo *Fusarium verticillioides* apresentou incidência de 98% nos grãos de milho em testes realizados sem desinfestação superficial [19], dados similares se comparados aos apresentados neste trabalho.

Resultados obtidos em estudo com o objetivo de identificar os pontos críticos de crescimento fúngico durante o período pré-colheita do milho no estado do Rio Grande do Sul, indicaram a presença de fungos do gênero *Fusarium* com incidência de 90% durante a maturação fisiológica dos grãos, período no qual os grãos não acumulam mais matéria seca, favorecendo a associação dos fungos aos grãos [20].

Na determinação da microbiota fúngica, em três híbridos de milho recém-colhidos, provenientes de três regiões do Estado de São Paulo, com incidência de 71% de fungos do gênero *Fusarium,* os autores concluíram que fatores abióticos, tais como

teor de água, precipitação pluvial e a temperatura do ar influenciaram diretamente na contaminação fúngica e produção de micotoxinas [21].

Por ser considerado um fungo de campo, o *Fusarium* sp., invade os grãos e sementes durante o amadurecimento, em que as condições de temperatura (25 a 35 ºC) e umidade (13 a 16%) são mais elevadas, favorecendo seu desenvolvimento [12]. Em concordância, trabalho realizado no estado do Paraná, na safra 2007/2008, fungos do gênero *Fusarium* apresentaram acréscimo na incidência em função do aumento do teor de água na colheita, porém com redução da incidência durante o período de armazenamento [22].

Fungos do gênero *Aspergillus* sp. foram identificados em todas as amostras analisadas, com variação de infestação entre unidades armazenadoras de 3 a 63% na 1ª coleta, de 18 a 83% para a 2ª coleta e de 23 a 84% na 3ª coleta e média de 50,13% de incidência deste fungo para as três coletas.

Fungos do gênero *Penicillium* sp. também foram identificados em todas as amostras analisadas. A variação de infestação foi de 24 a 90% na 1ª coleta, de 37 a 92% na 2ª coleta e de 41 a 78% para a 3ª coleta e média de 70,08% de infestação para as três coletas.

Houve aumento da incidência dos fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., possivelmente em função do aumento do teor de água dos grãos. Nesta pesquisa, a incidência dos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* apresentaram valores similares a outros autores [21,23].

Os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são considerados fungos de armazenamento, que necessitam de teores de água entre 13 e 18%, respectivamente, para se desenvolverem, sendo sua incidência pouco frequente durante o crescimento no campo e nos grãos recém-colhidos [12]. Entretanto, na presente pesquisa os teores de água ficaram abaixo do percentual de 13%, havendo incidência dos fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* nas amostras analisadas de milho armazenado [17].

A utilização de sementes contaminadas com fungos possibilita, sob condições favoráveis, a transmissão desses para os colmos e raízes primárias, e

consequentemente para as plantas e os grãos [24]. O tratamento de sementes com produtos fitossanitários diminui a incidência de fungos, reduzindo, consequentemente, a taxa de transmissão dos patógenos para as novas plantas [25].

Apesar de todas as amostras deste trabalho apresentar teor de água dentro de níveis seguros para armazenamento, desfavoráveis de crescimento fúngico, a presença desses fungos associados aos grãos, colhidos com baixos teores de água, se explica pela possibilidade de que os grãos possam ter sido contaminados ainda no campo, pois propicia o desenvolvimento destes fungos que tem menor exigência de teores de água ou pela utilização de sementes contaminadas por fungos [12].

Nas safras de 2009 e 2010, no estado de Mato Grosso, foi constatada a presença dos fungos *Aspergillus* sp. (0 a 20% de incidência) e de *Penicillium* sp. (20 a 40% de incidência) em grãos de milho armazenados com teores de água dentro dos padrões estabelecidos por legislação [17].

Em híbridos de milho recém-colhidos no estado de São Paulo, a incidência de fungos do gênero *Aspergillus* foi em média de 22,75%, de contaminação [21]. Valores similares de contaminação foram encontrados para *Aspergillus* sp (23,6%), em grãos de 5 híbridos de milho recém-colhidos, umidade de 18%, em Santa Maria no estado do Rio Grande do Sul [23].

A incidência de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, em trabalho realizado no estado do Paraná, na safra 2007/2008 apresentou decréscimo em função da elevação de umidade de colheita dos grãos [22]. Entretanto, neste trabalho, os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* apresentaram aumento da incidência em função da elevação da umidade dos grãos.

Fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. são conhecidos por colonizarem substratos com baixos teores de água, em torno de 12,5%. Entretanto, os teores de água apresentados nas amostras de milho coletadas neste trabalho, encontravam-se abaixo de 10%, desfavorável para o desenvolvimento desses fungos [12].

Fungos do gênero *Penicillium,* com incidência média de 46,7% e teores de água entre 10 e 12%, foram identificados em híbridos de milho recém-colhidos no estado de São Paulo [21].

Na avaliação da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de milho tratadas com produtos fitossanitários, durante o armazenamento, foi observado um decréscimo da incidência do fungo do gênero *Penicillium* depois de um período de seis meses de armazenamento em dois híbridos testados [26]. Os resultados desse trabalho diferem dos resultados encontrados nesta pesquisa, que mostraram haver um aumento da incidência do fungo *Penicillium* sp. nas amostras analisadas, vale ressaltar que em grãos não é realizado o tratamento com fitossanitários por se tratar de alimento para consumo direto.

A incidência do *Cladosporium* sp. foi de 32 a 90% para 1ª coleta, de 43% a 75% na 2ª coleta e de 39 a 85% na 3ª coleta, com média de 60,79% de incidência para as três coletas. Por se tratar de um fungo contaminante, o *Cladosporium* sp. pode indicar falhas nos processos de beneficiamento, transporte e/ou acondicionamento dos grãos.

A incidência dos fungos associados aos grãos de milho armazenados, utilizando teste de sanidade, com desinfestação, nas cidades de Sorriso e Sinop, obtidos em três coletas, é apresentada na Figura 5.

No presente estudo foram detectados os fungos *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Rhizopus* sp. *e Nigrospora* sp. pelo teste de sanidade com desinfestação.

O fungo *Fusarium* sp. foi encontrado em todas as amostras analisadas, com desinfestação prévia. Os índices de infestação diminuíram, com média de infestação de 30,1%, se comparados com as amostras analisadas sem desinfestação superficial, que apresentaram incidência média de 90% de associação fúngica aos grãos.

A incidência do fungo *Fusarium* sp., entre as unidades variou de 28 a 40% para a 1ª coleta, de 22 a 38% para a 2ª coleta e de 24 a 32% na 3ª coleta, indicando a presença desse fungo no interior do grão.

Em estudo em sementes de milho submetidas ao teste de sanidade com desinfestação superficial, foi constatada a incidência de 41% do fungo *Fusarium verticilioides* [19], resultado similar ao obtido nesta pesquisa. Por se tratar de sementes

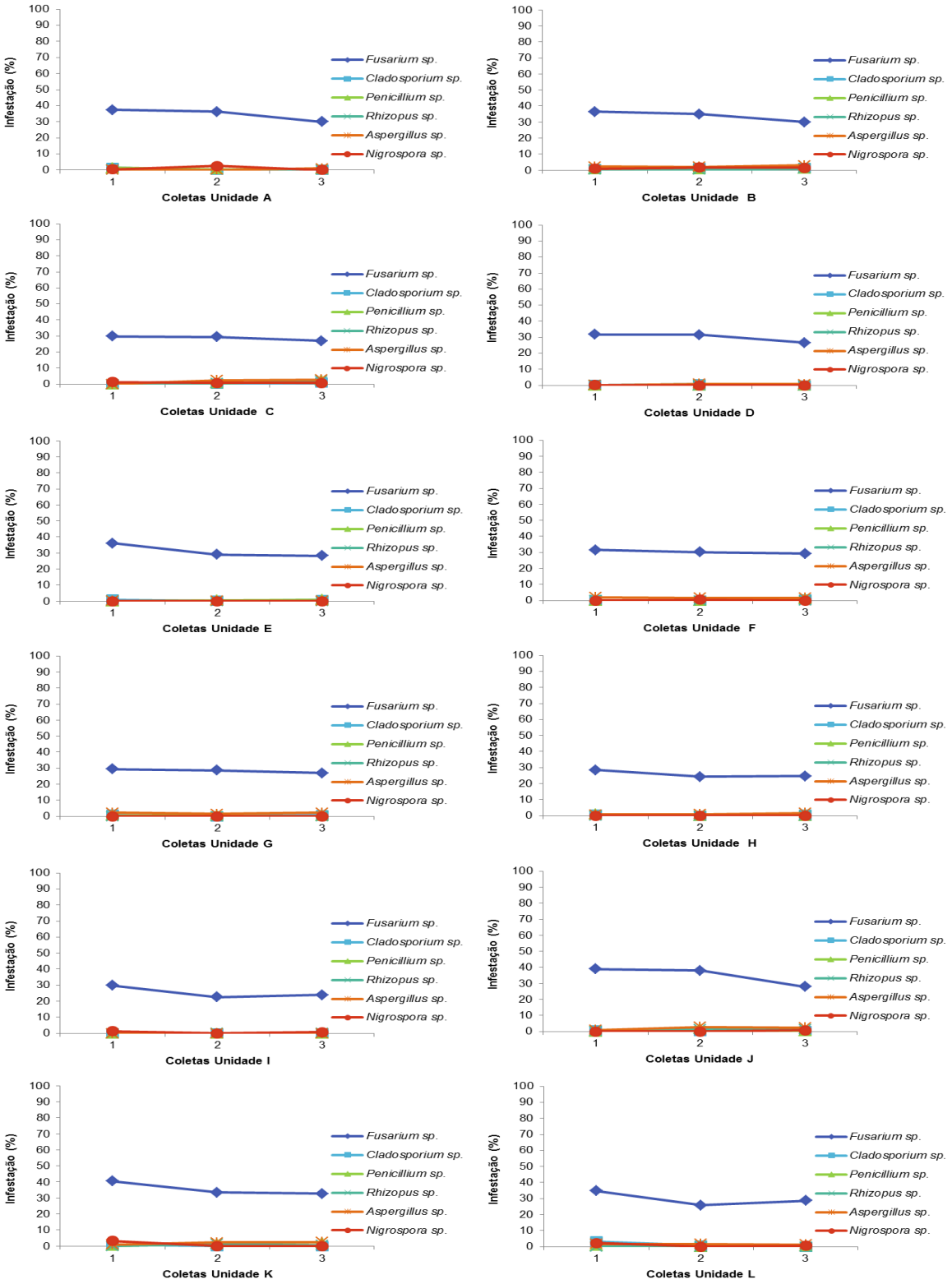

Figura 5 – Incidência média de fungos associados aos grãos de milho armazenados, por coleta realizada, submetidos ao "blotter test" com desinfestação, nas unidades armazenadoras das cidades de Sorriso e Sinop/MT, safra 2014.

A incidência dos fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* obtida pelo teste de sanidade, com desinfestação, também apresentou redução acentuada se comparada com a incidência apresentada no teste de sanidade sem desinfestação.

As médias de incidência dos fungos associados aos grãos armazenados nas três coletas por unidades de armazenamento, sem desinfestação e com desinfestação, são apresentadas nas figuras 6 e 7, respectivamente.

Para o gênero *Aspergillus*, a variação foi de 0 a 2% para a 1ª coleta e de 0,0 a 3% para a 2ª e 3ª coletas, com média de 1,67% de incidência para as três coletas.

O fungo *Penicillium* sp. apresentou uma variação de incidência de 0 a 1,5% para a 1ª coleta, de 0 a 2% na 2ª coleta e de 0 a 2,5% para a 3ª coleta. A média de incidência deste fungo foi de 0,46% para as três coletas.

Houve redução significativa da incidência dos fungos em relação às análises realizadas sem desinfestação prévia da superfície dos grãos, com média de infestação que diminuiu de 48 para 1,5% e, 60 para 1% com desinfestação prévia da superfície dos grãos, para *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., respectivamente.

Valores de infestação encontrados no presente estudo foram similares aos encontrados em estudo realizado no estado de São Paulo, com desinfestação, com incidência de 0 e 1% para os fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., respectivamente. Os autores concluíram que a redução da infestação se deve ao tipo de associação superficial dos fungos aos grãos [19].

Fungos do gênero *Cladosporium* apresentaram incidência entre 0 e 3% na 1ª coleta, de 0 e 1% na 2ª coleta e de 0 e 1% na 3ª coleta, com redução da incidência, se comparado com o teste de sanidade realizado, sem desinfestação. A incidência média entre as unidades de armazenamento foi de 0,42% nas três coletas analisadas.

Estudos para detecção de fungos em sementes de amendoim demonstraram que a desinfestação superficial das sementes resultou em redução da ocorrência de *Rhizopus* sp., aumento da incidência de *Fusarium* sp. e redução da incidência dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*. Os autores concluem que essa

inversão de incidência dos fungos ocorre independentemente dos procedimentos de incubação e de restrição hídrica [27].

O fungo *Nigrospora* sp., com média de infestação de 0,46%, apresentou incidência para grãos desinfestados superficialmente, isso porque houve remoção de fungos de crescimento rápido da superfície dos grãos, tais como, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., os quais inibem o crescimento de fungos de crescimento mais lento [26].

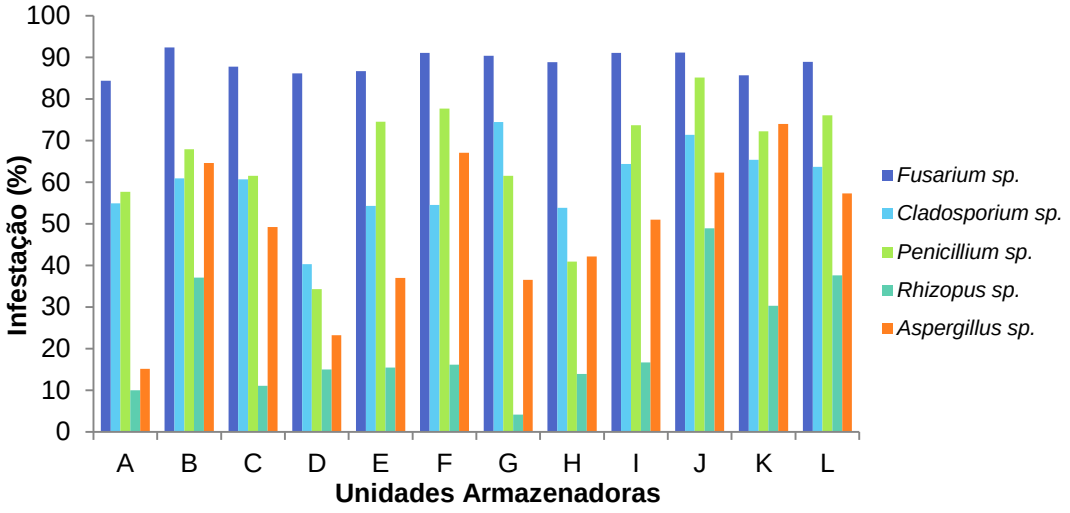

Figura 6 – Incidência média de fungos associados aos grãos de milho em três coletas realizadas por unidade de armazenamento, sem desinfestação, nas cidades de Sorriso e Sinop/MT, safra 2014.

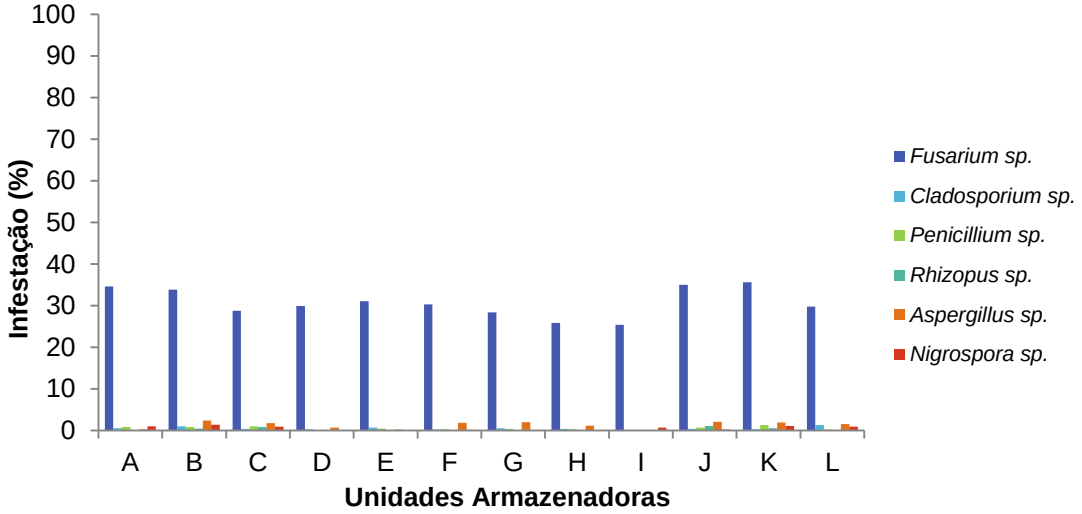

Figura 7 – Incidência média de fungos associados aos grãos de milho em três coletas realizadas por unidade de armazenamento, com desinfestação, nas cidades de Sorriso e Sinop/MT, safra 2014.

3.5 Ocorrência de Micotoxinas

Fumonisinas totais (FB_1+FB_2) foram detectadas em 100% das amostras analisadas, com variação entre 2.829 e 23.630 µg.kg^{-1}. Em 75% das amostras os níveis observados ultrapassaram o limite máximo tolerável (LMT) pela legislação vigente [29], de 5.000 µg.kg^{-1} e pela União Europeia [30], com limite máximo de 4000 µg.kg^{-1} em milho para posterior processamento, chegando a ultrapassar aproximadamente 5 vezes o limite máximo tolerado (LMT) (Tabela 3).

As unidades de armazenamento C (3.984 µg.kg^{-1}) e E (2.828 µg.kg^{-1}), localizadas em Sorriso, e a unidade L (3.653 µg.kg^{-1}) localizada em Sinop apresentaram concentração de fumonisinas (FB_1+FB_2) dentro dos limites máximos tolerados descritos pela ANVISA e pela União Europeia para grãos inteiros. As demais unidades de armazenamento, A (9.398 µg.kg^{-1}), B (6.800 µg.kg^{-1}), D (5.631 µg.kg^{-1}), F (15.107 µg.kg^{-1}), G (10.849 µg.kg^{-1}), H (10.298 µg.kg^{-1}), I (13.212 µg.kg^{-1}), localizadas em Sorriso, e as unidades J (10.354 µg.kg^{-1}) e K (23.629 µg.kg^{-1}), localizadas em Sinop apresentaram concentração de fumonisinas totais acima dos limites máximos tolerados pela legislação vigente (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentração (µg.kg^{-1}) de micotoxinas em grãos de milho armazenados nos municípios de Sorriso e Sinop/MT, coletados na safra 2014.

Unidade	**Micotoxinas (µg.kg^{-1})**								
	FB_1	FB_2	FB Total	AFB_1	AFB_2	AFG_1	AFG_2	AF Total	ZEA
A	8737,87	661,25	9399,12	1,31	Nd	Nd	Nd	1,31	Nd
B	6271,02	529,14	6800,16	1,32	Nd	Nd	Nd	1,32	Nd
C	3694,17	290,46	3984,63	1,73	Nd	Nd	Nd	1,73	Nd
D	5261,49	369,76	5631,25	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
E	2583,15	245,76	2828,91	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
F	14185,09	922,29	15107,38	2,73	<0,7	Nd	Nd	2,73	Nd
G	10165,10	684,10	10849,19	1,34	<0,7	1,57	0,49	3,40	Nd
H	9464,27	834,30	10298,57	1,38	Nd	Nd	Nd	1,38	Nd
I	12132,75	1080,14	13212,89	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
J	9652,20	702,06	10354,26	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
K	21870,51	1759,36	23629,87	1,41	Nd	1,5	Nd	2,91	Nd
L	3414,63	239,30	3653,93	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

FB_1: Fumonisina B_1; **FB_2:** Fumonisina B_2; **FB Total:** Fumonisina Total; **AFB_1:** Aflatoxina B_1; **AFB_2:** Aflatoxina B_2; **AFG_1:** Aflatoxina G_1; **AFG_2:** Aflatoxina G_2; **AF Total:** Aflatoxina Total; **ZEA:** Zearalenona; **Nd:** Não detectado.

O conhecimento das condições de produção das micotoxinas pode contribuir na prevenção da contaminação nos alimentos. A presença das micotoxinas pode ser controlada através do monitoramento quanto à presença dos fungos presentes nos grãos, contribuindo para o direcionamento adequado da matéria-prima, evitando-se problemas de saúde dos consumidores.

A presença de fumonisinas foi detectada em todas as amostras de 65 híbridos analisados no estado de Arkansas nos Estados Unidos no período safra de 1998 a 2001, com níveis médios de contaminação que variaram de 70 a 55.000 $\mu g.kg^{-1}$ para FB_1, predominante nas amostras analisadas, e de 20 a 22.000 $\mu g.kg^{-1}$ para FB_2 [31], estando acima dos valores encontrados nesta pesquisa.

Fumonisinas FB_1 e FB_2 foram detectadas em três províncias chinesas no ano de 2015, sendo que 39,7% de um total de 146 amostras estavam contaminadas por estas toxinas. O nível de contaminação para FB_1 variou de não detectado (ND) a 15.221 $\mu g.kg^{-1}$. A variação da FB_2 ficou entre não detectado (ND) a 7.141 $\mu g.kg^{-1}$. Para fumonisinas totais variou de não detectado (ND) a 22.362 $\mu g.kg^{-1}$. Fumonisinas FB_2 apresentaram nível de contaminação inferior a FB1 [32]. Dados semelhantes foram encontrados no presente trabalho.

Entre as micotoxinas produzidas por *Fusarium* sp., as fumonisinas são consideradas as mais importantes devido à sua elevada incidência, níveis de produção e toxicidade [33]. Considerando que a produção máxima de fumonisina ocorre a 30 ºC [34] as médias de temperatura encontradas na região do estado do Mato Grosso (27 a 30 ºC) podem explicar a presença dos fungos do gênero *Fusarium* e por consequência, fumonisinas em todas as amostras analisadas.

A elevada incidência de *Fusarium* sp. encontrada nos grãos de milho detectados pelo método “Blotter test”, explica a alta concentração da fumonisina, sendo encontrada em maior abundância a FB_1, considerada mais tóxica, seguida da FB_2 [35]. O alto índice de incidência desta micotoxina pode ter significativas implicações relacionadas à segurança alimentar na saúde humana e animal, tanto que, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classificou as fuminisinas como prováveis carcinógenos [36].

Produtos com altos índices de contaminação por micotoxinas, como milho, amendoim e arroz, não são aceitos em países (Estados Unidos e União Europeia) com regulamentação mais criteriosa, onde os limites máximos tolerados são inferiores aos estabelecidos no Brasil. Essa diferença nos limites de contaminação pode dificultar as exportações de produtos agrícolas, fazendo com que esses produtos contaminados sejam exclusivamente consumidos no mercado interno. Caso esses produtos forem consumidos, trarão riscos à saúde dos consumidores pela exposição contínua a essas substâncias tóxicas.

Dentro de um mesmo gênero de fungo como *Aspergilllus* pode haver diferenças em relação à síntese de aflatoxinas entre as espécies produtoras [37]. A presença de fungos potencialmente toxigênicos nos alimentos não significa que haverá a produção de micotoxinas, assim como pode ser evidenciada a presença de micotoxinas presentes nos alimentos e não haver a constatação de incidência do fungo produtor [38].

Aflatoxinas totais (B_1+B_2+G_1+G_2) foram identificadas em 60% das amostras analisadas, com variação de 1.31 a 3.40 $\mu g.kg^{-1}$. Em todas as amostras analisadas os níveis observados ficaram abaixo do limite máximo tolerado pela ANVISA que é de 20 $\mu g.kg^{-1}$ e de 10 $\mu g.kg^{-1}$ para a União Europeia (Tabela 3).

Nas amostras analisadas, a aflatoxina B_1 foi a mais encontrada, estando presente nas unidades A (1,31 $\mu g.kg^{-1}$), B (1,32 $\mu g.kg^{-1}$), C (1,73 $\mu g.kg^{-1}$), F (2,73 $\mu g.kg^{-1}$), G (1,43 $\mu g.kg^{-1}$), H (1,38 $\mu g.kg^{-1}$) localizadas em Sorriso e na unidade K (1,41 $\mu g.kg^{-1}$) localizada em Sinop. As demais unidades, D, E e I, localizadas em Sorriso e nas unidades J e L, localizadas em Sinop não houve detecção da aflatoxina B_1. Para a aflatoxina B_2, somente as unidades F e G, localizadas em Sorriso apresentaram a micotoxina, com valores menores que 0,7 $\mu g.kg^{-1}$ para ambas as unidades. A aflatoxina G_1 foi detectada na unidade G (1,57 $\mu g.kg^{-1}$) e na unidade K (1,50 $\mu g.kg^{-1}$). Nas demais unidades não houve detecção desta micotoxina. A unidade G (0,49 $\mu g.kg^{-1}$), localizada em Sorriso, foi a única a apresentar a aflatoxina G_2.

Apesar de não excederem os limites máximos tolerados, a presença desta micotoxina representa um risco à saúde humana e de animais por ser um composto altamente tóxico e potencialmente carcinogênico [36].

Os principais fatores que podem influenciar no crescimento de fungos toxigênicos e produção de micotoxinas são a umidade relativa do ar, temperatura e teor de água dos grãos [12, 39].

Em condições de temperatura e umidade favoráveis, os fungos *Aspergillus* sp. podem produzir micotoxinas nos grãos ainda no campo, com a colonização dos estigmas produzindo aflatoxinas [40]. Em amostras de milho recém-colhidas no estado de Goiás, os grãos apresentavam concentrações de aflatoxinas (B_1, B_2, G_1 e G_2) antes do período de armazenamento, com níveis de 0 a 277, 8 $\mu g.kg^{-1}$ para B_1, de 0 a 14 $\mu g.kg^{-1}$ para B_2 e de 0 a 34,1 $\mu g.kg^{-1}$ de G_1, não apresentando contaminação por aflatoxina G_2 [37].

Em unidades armazenadoras de 4 regiões do estado de Mato Grosso nas safras de 2009 e 2010, das 84 amostras de milho analisadas, a ocorrência de aflatoxinas foi constatada em 19,04% das amostras da safra 2009, e 23,80% da safra 2010 apresentaram contaminações que variaram de 1 a 108,7 $\mu g.kg^{-1}$. Para a AFB_1, houve variação de 1,9 a 12,2 $\mu g.kg^{-1}$, para AFB_2 foi de 1 a 4,6 $\mu g.kg^{-1}$, para AFG_1 foi de 1,5 a 22,6 $\mu g.kg^{-1}$ e para AFG_2 foi de1 a 1,8 $\mu g.kg^{-1}$. Apesar dos grãos apresentarem teores de água desfavoráveis para síntese de micotoxinas, as amostras analisadas obtiveram alto índice de contaminação por aflatoxinas. Esses altos valores encontrados podem ser atribuídos à produção da micotoxina ainda no campo [17].

Em avaliação de cinco híbridos de milho quanto ao desenvolvimento de fungos e síntese de aflatoxinas em Santa Maria no Rio Grande do Sul, a média de aflatoxinas produzidas em cultivos por 5 dias variou de 3.152 a 6.370 $\mu g.kg^{-1}$ para AFB_1, de 66 a 127 $\mu g.kg^{-1}$ para AFB_2, de 3.997 a 25.955 $\mu g.kg^{-1}$ para AFG_1 e de 287 a 547 $\mu g.kg^{-1}$ para AFG_2 Em cultivos de 10 dias, a variação média foi de 4.260 a 10.484 $\mu g.kg^{-1}$ para AFB_1, de 247 a 1.013 $\mu g.kg^{-1}$ para AFB_2, de 14.016 a 43.605 $\mu g.kg^{-1}$ para AFG_1 e de 1191 a 5.432 $\mu g.kg^{-1}$ para AFG_2 [23].

No estado do Arkansas nos Estados Unidos, anos de 1998 a 2001, 65 híbridos de milho foram analisados quanto a presença de aflatoxinas, em 84,2% das amostras foram observados a presença da aflatoxina B_1, variando de 6 a 1.120 $\mu g.kg^{-1}$, sendo a toxina predominante em todas as amostras. Aflatoxinas B_2 foram encontradas somente em 10,8% dos híbridos analisados, com variação entre 36 a 69 $\mu g.kg^{-1}$ [17].

Não foi contatada a presença da micotoxina zearalelona em nenhuma das amostras analisadas neste estudo.

4. CONCLUSÕES

Os grãos de milho armazenados na região Médio-Norte do estado de Mato Grosso estão contaminados com fungos micotoxigênicos *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp.e *Penicillium* sp.

Em todas as amostras analisadas foram detectadas fumonisinas (FB_1 e FB_2), sendo que na maioria os valores apresentados estão acima dos limites máximos tolerados pela legislação vigente, caracterizando um risco a saúde animal e humana.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Duarte J O, Cruz J C, Garcia J C, Mattoso M J. (2008). Economia da produção. In: CRUZ J C (Ed.), Cultivo do milho, Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo.

[2] Koblitz M. (2011). Matérias - Primas Alimentícias: Composição e Controle de Qualidade. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan.

[3] IMEA (2014). Instituto Mato-grossense de Economia Agropecuária. Disponível em<http://www.imea.com.br/upload/publicacoes/arquivos/R403__7_Estimativa_de_safra_de_milho_2013-14__10_08_21.pdf>.

[4] Silva J S. (2008). Secagem e armazenagem de produtos agrícolas. Viçosa: Aprenda Fácil.

[5] Pitt J I. (2000).Toxigenic fungi: which are important. Medical Micology. Oxford, 38, 17-22.

[6] Van Egmond H P. (1989). Mycotoxins in dairy products. Elsevier Applied Science, London (UK).

[7] Mallmann C A, Dilkin P (2007). Micotoxinas e micotoxicoses em suínos. Santa Maria: Ed. do Autor.

[8] Brasil. (2009). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Regras para Análise de Sementes. Brasília.

[9] Neergaard P. (1979). Seed Pathology. London, Macmillan.

[10] Farias C. (2003). Inibição de germinação de sementes de trigo e milho em teste de sanidade em substrato de papel. Rev. bras. agrociência, 9 (2),141-144.

[11] Food and Drug Administration. (2013). ORA Lab Manual. Disponível em http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/FieldScience/LaboratoryManual/UCM092245.pdf.

[12] Lazzari F A. (1997). Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações. Curitiba, Ed. do Autor.

[13] Brasil. (2011). Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução normativa Nº 60 de 22 de Dezembro de 2011. Disponível em http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1739574738.

[14] Almeida A V, Botura M, Abreu R, Bittencourt T, Batatinha M, (2009). Ocorrência de aflatoxinas em milho destinado à alimentação de aves no estado da Bahia. Arquivos do Instituto Biológico, 76(3), 353-358.

[15] Silva L C, (2010). Estruturas para Armazenagem a Granel. Disponível em http://www.agais.com/manuscript/ag0210_armazenagem_granel.pdf.

[16] Nascimento V. (2012). Desempenho de estratégias de aeração de milho armazenado: Fungos e condutividade elétrica. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. 16, 113–121.

[17] Bento L F. (2011). Qualidade física e sanitária de grãos de milho armazenados em Mato Grosso [tese]. Universidade Federal de Mato Grosso.

[18] Tanaka M A S, Maeda J A, Plazas I H A Z. (2001). Microflora fúngica de sementes de milho em ambientes de armazenamento. Scientia Agricola, 58 (3), 501-508.

[19] Cappelini L T D, Pazzini R C, Vieira R D, Galli A. (2005). Efeito de Fusarium moniliforme na qualidade de sementes de milho. Cientifica, 33 (2), 185-191.

[20] Hermanns G, Pinto F T, Kitazawa S E, Noll I B. (2006). Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. Ciênc. Tecnol. Alimentos, 26, 7-10.

[21] Almeida A P, Correa B, Mallozzi M A B. (2000). Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo. 31 (4), 321-326.

[22] Marques O J, Filho P S, Dalpasquale V A, Scapim C A, Pricinotto L F, Júnior M M. (2009). Incidência fúngica e contaminações por micotoxinas em grãos de híbridos comerciais de milho em função da umidade de colheita. Acta Scientiarum. Agronomy, 31 (4), 667-675.

[23] Dilkin P, Mallmann C A, Santurio J M, Hickmann J L. (2000). Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de aflatoxinas em híbridos de milho. Ciência Rural, 30, 137-141.

[24] Teixeira H, Machado J C. (2003). Transmissibilidade e efeito de *Acremonium strictum* em sementes de milho. Ciênc. e Agrotec., vol.27 no.5 Lavras.

[25] Machado J C. (2000). Tratamento de sementes no controle de doenças. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE. 138p.

[26] Pereira C E, Oliveira J A, Evangelista J R E. (2005). Qualidade fisiológica de sementes de milho tratadas associadas a polímeros durante o armazenamento. Ciênc. Agrotec., 29 (6), 1201-1208.

[27] Araújo A E S, Castro A P G, Rossetto C A V. (2004). Avaliação de metodologia para detecção de fungos em sementes de amendoim. Rev. bras. Sementes, 26 (2), 45-55.

[28] Wenzel J B, Siqueira A L, Burin F A G, Hein D P R, Silveira J A, Romani S. (2012). Isolamento e atividade antagonística de fungos endofíticos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill*).* SaBios: Rev. Saúde e Biol., 7 (3), 86-96.

[29] Anvisa (2011). Resolução RDC Nº 7, de 18 de Fevereiro de 2011. Disponível emhttp://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/bc17db804f45fe2cbd41fdd785749fbd/Resolu%C3%A7%C3%A3o+0-2011-CGALI.pdf?MOD=AJPERES.

[30] The Commission of the European Communities. Regulation (EC) Nº 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products. Off. J. Eur. Union, 255, 14–17, 2007.

[31] Abbas H K, Cartwright R D, Xie W, Shier W T. (2006). Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. Crop Protection, 25, 1-9.

[32] Li R, Tao B, Pang M, Liu Y, Dong J. (2015). Natural occurrence of fumonisins B1 and B2 im maize from main maize-producing provinces in China. Foodd Control, 50, 838-842.

[33] Volkel I, Schroer-merker E, Claus-peter C. (2011). The carry-over of mycotoxins in products of animal origin with special regard to its implications for the european food safety legislation. Food Nutr. Sci.

[34] Fanelli F, Iversen A, Logrieco A F, Mulè G, (2013). Relationship between fumonisin production and FUM gene expression in Fusarium verticillioides under different environmental conditions. Food Addit. Contam., 30, 365-371.

[35] Labuda R, Tancinova D, Hudec K. (2003). Identification and enumeration of Fusarium species in poultry feed mixtures from Slovakia. *Ann. Agric. Environ. Med*, *10*, 61.

[36] International Agency for Research on Cancer (IARC). (2002). Summaries & Evaluations, Fumonisin B1, 301.

[37] Scussel V M. (1998). Micotoxinas em alimentos. Florianópolis: Editora Insular

[38] Ramos C R B A, Brasil E M, Geraldine R M. (2008). Contaminação por aflatoxinas em híbridos de milho cultivados em três regiões do estado de Goiás. Pesq. Agropec. Tropic. 38(2):95-102.

[39] Farias A X, Robb C F, Bittencourt A M. (2000). Contaminação endógena do Aspergillus spp. em milho pós-colheita no estado do Paraná. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 35 (3), 617-621.

[40] Embrapa. (2007). Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical.