

UNIVERSIDADE ESTADAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu*
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Paula Jerusa Lustoza Marques

**AVALIAÇÃO DE AFLATOXINA E ZEARALENONA EM QUIRERA
(CANJIQUINHA DE MILHO) NA REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS**

PONTA GROSSA
2007

UNIVERSIDADE ESTADAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu*
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Paula Jerusa Lustoza Marques

**AVALIAÇÃO DE AFLATOXINA E ZEARALENONA EM QUIRERA
(CANJIQUINHA DE MILHO) NA REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Dr^a. Nelci Catarina Chiquetto

PONTA GROSSA
2007

TERMO DE APROVAÇÃO

PAULA JERUSA LUSTOZA MARQUES

AVALIAÇÃO DE AFLATOXINAS E ZEARALENONA EM QUIRERA
(CANJIQUINHA DE MILHO) NA REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte Banca Examinadora:

Ponta Grossa, 01 de junho de 2007.


Profª. Drª. Nelci Catarina Chiquetto Silva
UEPG/PR


Profª. Drª. Mareci Mendes de Almeida
UEPG/PR


Profº. Drº. Rupércio Alvares Cançado

Ponta Grossa
2007

Dedico este trabalho a meus pais, Marques e Rute, por dedicarem suas vidas a mim e por nunca medirem esforços para que minha vida tivesse vitórias como esta. E a você Misael, que desde o momento que entrou na minha vida, me amou e me incentivou.

...Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus. Devo minha vida e todas minhas realizações a Ele, que me guia e ouve minhas orações, fazendo sempre tudo de acordo com Sua vontade.

A toda minha família, em especial meus pais, Rute e Marques, pelo apoio, incentivo e amor dedicado a mim. A tia Marli, pelo tempo dedicado a correção da língua portuguesa deste trabalho.

Ao meu esposo Misael, pela compreensão na minha ausência e total apoio e amor dedicado a mim.

A Professora Dr^a. Nelci Catarina Chiquetto, pela orientação, ensinamento e incentivo.

Ao professor Francisco Fanhucchi Neto, por toda disposição em atender-me e total disponibilização de equipamentos necessários para realização de análises para conclusão deste trabalho.

Ao professor Ivo Mottin Demiate, pelas sugestões e colaboração com materiais necessários.

A coordenação e toda equipe de professores e funcionários da UEPG, que colaboraram indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Às laboratoristas Denise e Danianni, pelo auxílio e disposição em repartir seus conhecimentos. A Rita pela dedicação plena ao laboratório e a todos que utilizam desse lugar.

Aos amigos, Krischina pelo incentivo a iniciar o mestrado; Ana Mery pelo companheirismo e real amizade; Audie, Hanna, Cristiane, Leila, colegas de mestrado, parceiros de aulas e trabalhos.

A estagiária Josiane, pela colaboração nas análises físico-químicas.

Aos amigos da Fundação ABC, Ademir coordenador do laboratório, por repassar dados, interpretar resultados, e principalmente pela amizade; aos analistas Edson e César. Ao Rodrigo por me atender prontamente explicando e repassando dados de clima da região. Ao Volnei por total disposição e incentivo.

Ao SIMEPAR, por conceder dados climáticos da região.

A todos que de maneira direta e indiretamente colaboraram para realização desta pesquisa.

“O lugar específico que nos é designado na vida, é determinado por nossas capacidades. Nem todos atingem o mesmo desenvolvimento ou fazem com igual eficiência o mesmo trabalho. Deus não espera que o hissope atinja as proporções do cedro, ou a oliveira a altura da majestosa palmeira. Mas cada qual deve ter o objetivo de atingir tão alto quanto a união do poder humano com o divino lhe torne possível”.

Ellen G. White

RESUMO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) representa 43% da produção brasileira de grãos. Como outros cereais, o milho é susceptível ao ataque de fungos, incluindo os do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, que podem produzir metabólitos secundários com propriedades tóxicas que são designados de micotoxinas. Este trabalho tem como objetivos caracterizar, através de análises físico-químicas, amostras comerciais de quirera de milho destinadas à alimentação humana e animal; verificar a incidência de micotoxinas (aflatoxina e zearalenona) e caracterizar os aspectos da região como clima e armazenagem e a incidência de contaminação por micotoxinas. Foram adquiridas 47 amostras de quirera para consumo animal em 19 municípios da região dos Campos Gerais – PR. As análises físico-químicas foram realizadas com metodologias oficiais e as análises de micotoxinas através de imunoenaios. Os resultados físico-químicos foram comparados com os limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura. Das 47 amostras, para consumo animal, 46 apresentaram positividade para aflatoxina, e apenas uma não estava em conformidade com a legislação brasileira (teor máximo de 50 partes por bilhão). A legislação brasileira não estabelece limites para a micotoxina zearalenona, porém 51,06% das amostras apresentaram positividade para contaminação (100-5000 ppb). As amostras de quirera para consumo humano apresentaram homogeneidade com relação aos parâmetros físico-químicos o que indica boa seleção de matérias primas. Todas as amostras analisadas neste trabalho, não apresentaram contaminação por zearalenona, e o nível de contaminação de todas as que apresentaram positividade para aflatoxina estavam abaixo de 20 ppb que é o limite máximo permitido pela legislação brasileira. Os níveis de contaminação tanto para aflatoxina quanto para zearalenona indicaram que o consumo não implicaria em riscos à saúde. A incidência de chuvas durante a safra de 2005/2006 foi baixa, quando comparada com as safras de anos anteriores. Alguns locais de coletas estavam inapropriados para armazenamento. Os fatores climáticos e armazenagem podem influenciar na contaminação de grãos por fungos e conseqüentemente por micotoxinas, durante o plantio e a colheita.

Palavras chave: Micotoxinas, milho, quirera.

ABSTRACT

The maize culture (*Zea mays* L.) represents 43% of the Brazilian production of grains. As other cereals, the maize is susceptible to the fungus attack, including the ones of the *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* types that can produce secondary metabolites with toxic properties that are called of micotoxinas. The main objective of this work is to characterize, through physical-chemical analysis, commercial samples of grits of maize used in human being and animal feeding; verify the incidence of micotoxinas (aflatoxin and zearalenona) and to characterize the aspects of the region as the climate and the storage and the incidence of micotoxinas contamination. We used 47 samples of grits of maize for animal consumption in 19 cities of the Campos Gerais region - PR. The physical-chemical analysis was done with official methodologies and the micotoxinas analysis through immunological essays. The physical-chemical results were compared with the limits established by the Ministry of Agriculture. Among the 47 samples to animal consumption, 46 presented positiveness for aflatoxin, and just 1 was not in conformity with the Brazilian legislation (maximum limit of 50 parts for billion). The Brazilian legislation does not establish limits for the micotoxina zearalenona, however 51.06% of the samples had presented positiveness for contamination (100-5000 ppb). The samples of broken maize for human consumption presented homogeneity in relation to the physical-chemical parameters that indicates a good selection of raw-material. All the samples analyzed in this work, did not present any contamination by zearalenona, and the level of contamination of all the ones that presented positiveness for aflatoxin, they were below of 20 ppb that is the maximum limit allowed by the Brazilian legislation. The levels of contamination as for the aflatoxin as for zearalenona they indicated that the consumption would not imply in risks to the health. The rain incidence during the harvest of 2005/2006 was low, when compared with the harvests of previous years. Some collection places were improper for storage. The climatic factors and storage can influence consequently in the contamination of grains by fungus and by micotoxinas, during the plantation and the harvest.

Key words: Mycotoxins, corn, grits.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Sistema Agroindustrial do Milho – Brasil.....	8
FIGURA 2 – Mapa dos Campos Gerais do Paraná – Divisão Municipal.....	15
FIGURA 3 – Corte longitudinal do grão de milho.....	17
FIGURA 4 – Grãos de milho danificados e com presença de fungos.....	24
FIGURA 5 – Diagrama representativo das fases de produção de alimentos até consumo humano.....	29
FIGURA 6 – Estrutura da Aflatoxina B1, B2, G1 e G2.....	32
FIGURA 7 – Efeito da Aflatoxina no crescimento de frangos (ambos com 21 dias).....	34
FIGURA 8 – Efeito da Aflatoxina em fígado de frango.....	36
FIGURA 9 – Estrutura química geral da Zearalenona.....	38
FIGURA 10 – Reação antígeno – anticorpo.....	43
FIGURA 11 – Representação esquemática de um método imunoenzimático (ELISA).....	46
FIGURA 12 – Formas de embalagem e armazenagem das amostras coletadas.....	54
FIGURA 13 – Mapa dos Campos Gerais: Municípios de procedência.....	56
FIGURA 14 – Resíduo de varredura.....	67
FIGURA 15 – Moinho com local de armazenamento adequado.....	80
FIGURA 16 – Moinho com local de armazenamento inadequado.....	81

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Demanda do milho segundo atividades intermediárias ou consumo final- Brasil.....	9
GRÁFICO 2 – Evolução da Produção de Milho no Paraná, Safras 1993/94 a 2005/2006.....	16
GRÁFICO 3 – Condições de atividade de água e temperatura para desenvolvimento dos fungos.....	27
GRÁFICO 4 – Variação dos teores de proteína bruta.....	65
GRÁFICO 5 – Variação dos teores de lipídeos.....	66
GRÁFICO 6 – Variação dos teores de fibra bruta.....	67
GRÁFICO 7 – Distribuição dos teores de fibra bruta.....	68
GRÁFICO 8 – Variação dos teores de umidade.....	83
GRÁFICO 9 – Variação dos teores de cinzas.....	84
GRÁFICO 10 – Teores de Aflatoxina (ppb) em quirera de milho para consumo humano.....	87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	– Principais espécies de fungos responsáveis pela produção de micotoxinas.....	7
TABELA 2	– Exemplos da utilização do milho em diferentes segmentos – Brasil.....	10
TABELA 3	– Alimentos destinados à alimentação humana em que foram detectadas micotoxinas e seus efeitos tóxicos.....	31
TABELA 4	– Níveis máximos admissíveis de micotoxinas em alimentos estabelecidos na União Européia.....	50
TABELA 5	– Codificação das amostras segundo município de procedência e forma de armazenamento.....	55
TABELA 6	– Classificação dos ingredientes.....	61
TABELA 7	– Composição centesimal de amostras de quirera de milho para consumo animal.....	62
TABELA 8	– Estatística descritiva dos principais componentes das amostras de quirera de milho para consumo animal.....	64
TABELA 9	– Contaminação por Aflatoxina em quirera de milho para consumo animal nos municípios coletados.....	69
TABELA 10	– Incidência de Aflatoxina em quirera de milho para consumo animal.....	71
TABELA 11	– Incidência de Zearalenona em quirera de milho para consumo animal.....	73
TABELA 12	– Limites de Zearalenona estabelecidos.....	74
TABELA 13	– Fatores climáticos nos meses de plantio (setembro, outubro e novembro) e de colheita (janeiro, fevereiro e março) para algumas cidades da região do estudo (2005 – 2006).....	76
TABELA 14	– Incidência de contaminação por Aflatoxina e Zearalenona em amostras de milho de 2001 a 2006.....	78
TABELA 15	– Fatores climáticos nos meses de plantio (setembro, outubro e novembro) e de colheita (janeiro, fevereiro e março) para algumas cidade da região do estudo (2001 – 2004).....	79
TABELA 16	– Composição centesimal de amostras de quirera de milho para consumo humano.....	82

TABELA 17 – Estatística descritiva dos principais componentes das amostras de quirera de milho para consumo humano.....	83
TABELA 18 – Incidência de Aflatoxina e Zearalenona em quirera de milho para consumo humano.....	86

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	4
2.1	GERAL.....	4
2.2	ESPECÍFICOS.....	4
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1	MICOTOXINAS.....	5
3.2	A CULTURA DO MILHO.....	7
3.2.1	A Cultura do Milho ao Longo do Tempo.....	11
3.2.2	Produção de Milho: Brasileira, Paranaense e dos Campos Gerais.....	12
3.3	PROCESSAMENTO DO GRÃO DE MILHO.....	16
3.4	PADRÕES DE IDENTIDADE E QUALIDADE DO MILHO.....	18
3.5	VARIEDADES DE MILHO RESISTENTES ÀS CONTAMINAÇÕES POR FUNGOS.....	21
3.6	CONDIÇÕES PARA DESENVOLVIMENTO DO FUNGO E PRODUÇÃO DE MICOTOXINA.....	21
3.7	CONTAMINAÇÃO DOS ALIMENTOS POR MICOTOXINAS.....	28
3.8	PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS NOS ALIMENTOS.....	28
3.9	MICOTOXINAS E SAÚDE HUMANA E ANIMAL.....	30
3.10	ESTUDOS REALIZADOS EM ALIMENTOS PARA DETECÇÃO DE MICOTOXINAS.....	38
3.11	MÉTODOS CORRETIVOS E PREVENTIVOS.....	40
3.12	MÉTODOS IMUNOLÓGICOS DA DETECÇÃO E DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM ALIMENTOS.....	42
3.13	LEGISLAÇÃO.....	47
3.13.1	Legislação no Brasil.....	48
3.13.2	Legislação no Mercosul.....	49
3.13.3	Posições Adotadas pela União Européia (UE).....	49
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1	MATERIAL.....	51
4.2	MÉTODOS.....	52
4.2.1	Amostragem.....	52
4.2.2	Preparo da Amostra.....	53
4.2.3	Composição química.....	56
4.2.4	Determinação Micotoxinas.....	57
4.2.4.1	Aflatoxina.....	57
4.2.4.2	Zearalenona.....	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5.1	QUIRERA DE MILHO PARA CONSUMO ANIMAL.....	60
5.1.1	Caracterização físico-química.....	60
5.1.2	Análise Aflatoxina.....	69
5.1.3	Análise Zearalenona.....	72
5.1.4	Fatores Climáticos.....	75
5.2	QUIRERA DE MILHO PARA CONSUMO HUMANO.....	82
5.2.1	Caracterização físico-química.....	82
5.2.2	Análise Aflatoxina e Zearalenona.....	85
6	CONCLUSÃO.....	89
	REFERÊNCIAS.....	90

AVALIAÇÃO DE AFLATOXINA E ZEARALENONA EM QUIRERA (CANJIQUINHA DE MILHO) NA REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS

1 INTRODUÇÃO

O termo *food safety* (alimento seguro) significa garantia de consumo alimentar seguro, ou seja, produtos livres de contaminantes de natureza química (agroquímicos), biológica (organismos patogênicos), física ou de outras substâncias que possam colocar em risco a saúde (SPERS E KASSOUF, 1996).

Os programas de segurança alimentar devem propiciar controle de qualidade efetivo da cadeia alimentar, desde a produção, a armazenagem, a distribuição, até o consumo do alimento *in natura* ou processado. A segurança alimentar é preconizada por órgãos e entidades como a FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura) e a OMS (Organização Mundial de Saúde), no âmbito internacional e o Ministério da Saúde (MS), da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) no âmbito nacional (CAVALLI, 2001).

As culturas agrícolas, especialmente os cereais, são susceptíveis ao ataque de fungos, no campo ou durante o armazenamento. Os metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos que demonstram propriedades tóxicas em animais são designados genericamente de micotoxinas (CAST, 2003). A principal via de exposição é através da ingestão de alimentos contaminados. A preocupação com a presença de micotoxinas em alimentos e suas implicações na saúde aumentou à medida que se foram descobrindo novas micotoxinas e se reúnem dados sobre a sua ocorrência natural em alimentos e sobre a sua toxicidade em animais. Estima-se que em todo mundo, 25-50% de todos os grãos apresentam micotoxinas. (GRÃOS 100%... 2007).

A cultura do milho (*Zea mays* L.) representa 43% da produção brasileira de grãos. As regiões Sul e Sudeste são responsáveis por 80% da produção e só o Estado do Paraná (principal produtor do país) participa com 22% desse total (FARIAS et al., 2000).

Os principais problemas associados à cultura de milho, no Brasil, são incidências de pragas e plantas daninhas, e também as doenças que são causadas por vírus, bactérias e fungos, incluindo os dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (PEREIRA, 1997 apud MOLIN, 1999, p.2).

Segundo Lazzari (1997), *Aspergillus restrictus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus candidus* e *Penicillium sp*, desenvolvem-se internamente no embrião do trigo e do milho, sem sinal de dano ou mofo no exterior. As toxinas produzidas pelo *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* são denominadas aflatoxinas que são encontradas principalmente no milho, amendoim, sementes de algodão e castanhas diversas. As aflatoxinas são carcinogênicas, teratogênicas e mutagênicas sendo que uma das mais potentes substâncias carcinogênicas é a B₁, por causar câncer de fígado em seres humanos.

Diferentes espécies de fungos do gênero *Fusarium*, produzem a micotoxina zearalenona (uma lactona do ácido resorcíclico) a qual apresenta efeito estrogênico em animais domésticos (HAGLER; MIROCHA; PATHRE; 1979). Sua produção depende das condições climáticas sazonais, sendo mais prevalente nas estações frias e úmidas (DOKO et al., 1996 apud SASSAHARA, 2003; WHITLOW; HAGLER JUNIOR, 1999 apud SASSAHARA, 2003).

No Brasil, as pesquisas sobre a qualidade dos alimentos destinados ao consumo animal vêm, cada vez mais, apresentando os problemas causados por micotoxinas. O clima tropical e subtropical de certas regiões brasileiras é adequado ao desenvolvimento dos fungos, e possível produção de micotoxinas. O controle exigido pelas agências governamentais nacionais e internacionais e a exigência do próprio mercado, apontam para uma necessidade

da implementação de programas de prevenção e monitoramento da qualidade dos alimentos (SASSAHARA; YANAKA; PONTES NETTO, 2003).

A segurança alimentar deve ser tratada pro ativamente e ainda, para o investimento em grãos e rações com custos mais reduzidos são necessários programas abrangentes de avaliação de riscos e diagnóstico que podem incluir o controle fúngico na colheita e medição e monitoramento da qualidade quando do armazenamento e processamento. A cadeia de suprimentos apresenta elos críticos onde o valor é preservado ou perdido quando os fungos e micotoxinas são detectados ou são evitados (GRÃOS 100%... 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Verificar a qualidade da canjiquinha (quirera de milho) produzida nos Campos Gerais, destinada ao consumo humano e animal.

2.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar por meio de análises físico-químicas, amostras comerciais de quirera de milho destinadas à alimentação animal.
- Caracterizar por meio de análises físico-químicas, amostras de quirera de milho destinadas à alimentação humana.
- Verificar a incidência de aflatoxina e zearalenona em amostras de quirera *in natura* destinadas ao consumo animal.
- Verificar a incidência de aflatoxina e zearalenona em amostras de quirera *in natura* destinadas ao consumo humano.
- Discutir a incidência de contaminação por micotoxinas em relação ao clima regional e as condições de armazenamento.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MICOTOXINAS

Os fungos podem produzir, em condições naturais e laboratoriais, metabólitos secundários tóxicos (BETINA, 1989). Os metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos que demonstram propriedades tóxicas em animais são designados genericamente de micotoxinas (CAST, 2003).

O termo micotoxinas é originário do grego “mykes” (fungo), e do latim “toxicum” (toxina), formando a expressão greco-latina “mykes toxicum” que significa toxina fúngica (LAZZARI, 1997).

De acordo com Abramson (1998) o termo micotoxinas pode ser definido como “metabólitos secundários produzidos por fungos que ocorrem naturalmente como contaminantes de produtos agrícolas, e que demonstram toxicidade quando administrados por uma via natural, essencialmente por via oral” (SERRA, 2005).

Os metabólitos secundários são compostos biossintetizados e excretados através de um conjunto de vias metabólicas que não são essenciais para o crescimento e sobrevivência do organismo (BETINA, 1989). Estes compostos estão presentes no meio de cultura ou substrato onde os fungos crescem. Alguns metabólitos secundários fúngicos têm propriedades antibióticas, e alguns demonstram toxicidade para animais (CAST, 2003).

Os principais substratos para a produção dessas toxinas são os cereais, como milho, trigo, aveia, cevada, etc. (AMARAL et al., 2006).

Existem muitos tipos de micotoxinas, sendo que seis delas são consideradas importantes do ponto de vista de saúde pública: aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂), ocratoxina A, patulina, fumonisina, deoxinivalenol (DON) e zearalenona (AMARAL et al., 2006).

A presença do fungo no alimento, não está necessariamente ligada à produção da toxina. Existem cepas dentro de uma mesma espécie que não possuem a capacidade de

produção de metabólitos secundários (RANJAN; SINHA, 1991 apud ROSSETTO, 2005, p.310).

O número exato de micotoxinas e metabólitos fungicos tóxicos é desconhecido, apesar de ser possível fazer uma estimativa (SERRA, 2005). Turner (1978) catalogou aproximadamente 1200 metabólitos secundários produzidos por fungos. Turner e Alderidge (1983) registraram mais 2000 metabólitos produzidos por aproximadamente 1100 espécies, o que, em média, dá dois metabólitos únicos por espécie. Hawksworth (1991) verificou que são cerca de 69000 espécies fúngicas conhecidas, o que representa 5% das existentes no mundo, isto é, 1,5 milhões. Se considerarmos que existem dois metabólitos únicos por espécie, podem existir cerca de 3 milhões de metabólitos secundários produzidos por fungos. Aproximadamente 10% dos metabólitos secundários descritos por Turner e por Turner e Alderidge foram classificados como sendo tóxicos por Cole e Cox (1981) (SERRA, 2005). Estes investigadores listaram aproximadamente 300 compostos tóxicos, mas estima-se que possam existir entre 20000 a 300000, bem como uma grande diversidade de mecanismos de ação (CAST, 2003).

Os gêneros de fungos filamentosos responsáveis pela produção de micotoxinas consideradas mais relevantes para a saúde são *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Na Tabela 1 são apresentadas as principais espécies responsáveis pela produção de micotoxinas em alimentos.

TABELA 1 – Principais espécies de fungos responsáveis pela produção de micotoxinas

<i>Micotoxinas</i>	<i>Espécies produtoras</i>
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> ; <i>A. parasiticus</i>
Ocratoxina A	<i>Aspergillus ochraceus</i> ; <i>A. alliaceus</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>A. carbonarius</i> <i>Penicillium verrucosum</i> ; <i>P. nordicum</i>
Tricotecenos	<i>Fusarium spp.</i> <i>Myrotherium sp.</i> <i>Trichothecium sp.</i> <i>Calonectria sp.</i> <i>Stachybotrys sp.</i> <i>Cephalosporium sp.</i> <i>Verticimonosporium sp.</i>
Deoxinivalenol (DON)	<i>Fusarium roseum</i> ; <i>F. graminearum</i>
Zearalenona	<i>F. graminearum</i> e outros <i>Fusarium spp.</i>
Fumonisinás	<i>F. moniliforme</i> (= <i>F. verticillioides</i>); <i>F. proliferatum</i>
Citrinina	<i>P. citrinum</i> ; <i>P. expansum</i> ; <i>P. verrucosum</i> ; <i>A. alliaceus</i>
Ácido penicílico	<i>A. ochraceus</i> ; <i>P. aurantiogriseum</i> ; <i>P. viridicatum</i>
Patulina	<i>P. expansum</i> ; <i>P. griseofulvum</i> ; <i>A. clavatus</i>
Esterigmatocistina	<i>Aspergillus versicolor</i> ; <i>Emericella nidulans</i>
Ácido tenuazônico	<i>Alternaria alternata</i>
Penitrem A	<i>Penicillium crustosum</i>
Alcalóides do ergot	<i>Claviceps spp.</i>
Ácido ciclopiazônico	<i>A. flavus</i> ; <i>A. tamaritii</i> ; <i>P. commune</i>

FONTE: SERRA, 2005

3.2 A CULTURA DO MILHO

A partir do milho obtêm-se inúmeros derivados, empregados em várias indústrias como: alimentícia, de fermentação, química e mecânica (fundição de metais, plásticos entre outros) e de rações como grão, quirera, farelo, germe (PONCIANO; SOUZA; REZENDE, 2003).

Os segmentos que compõem o sistema agroindustrial do milho no Brasil estão demonstrados na Figura 1.

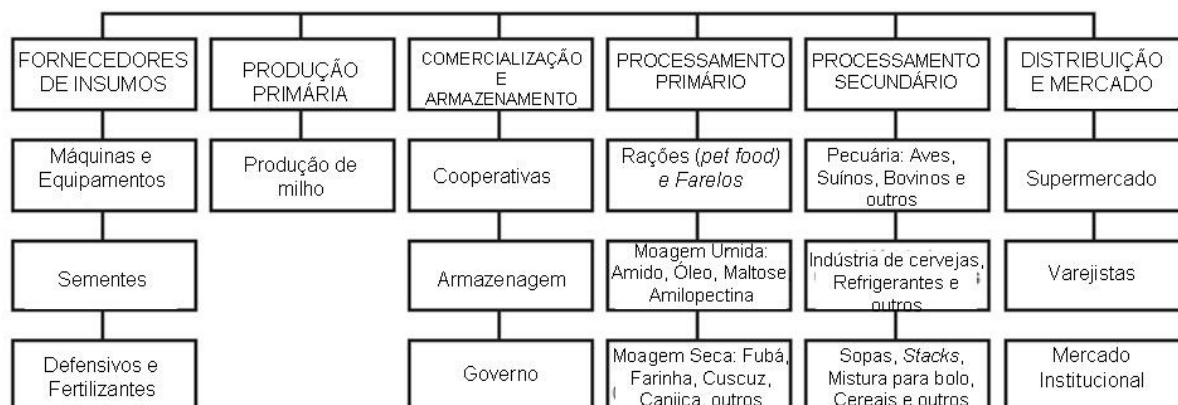


FIGURA 1 – Sistema Agroindustrial do Milho – Brasil

FONTE: PONCIANO; SOUZA; REZENDE, 2003.

No primeiro segmento, que compreende os insumos de produção, estão os setores de máquinas e equipamentos, produção de sementes e indústria de defensivos e fertilizantes. No segundo segmento, está a produção de milho, e no terceiro a comercialização e armazenagem, destacando-se as cooperativas, armazéns e o Governo. Nesse segmento também está a agroindústria, que efetua o processamento (indústria de rações, de moagem úmida e moagem a seco). Os derivados mais consumidos no país são: a farinha, a canjica e canjiquinha e o fubá. É da moagem a seco que se obtém o fubá, o milho degerminado, a quirera e os farelos. E da moagem úmida produzem-se o amido e a farinha de milho (PONCIANO; SOUZA; REZENDE, 2003).

No Gráfico 1 pode ser observada a demanda, segundo as diferentes atividades ou consumo final, em que o milho é utilizado.

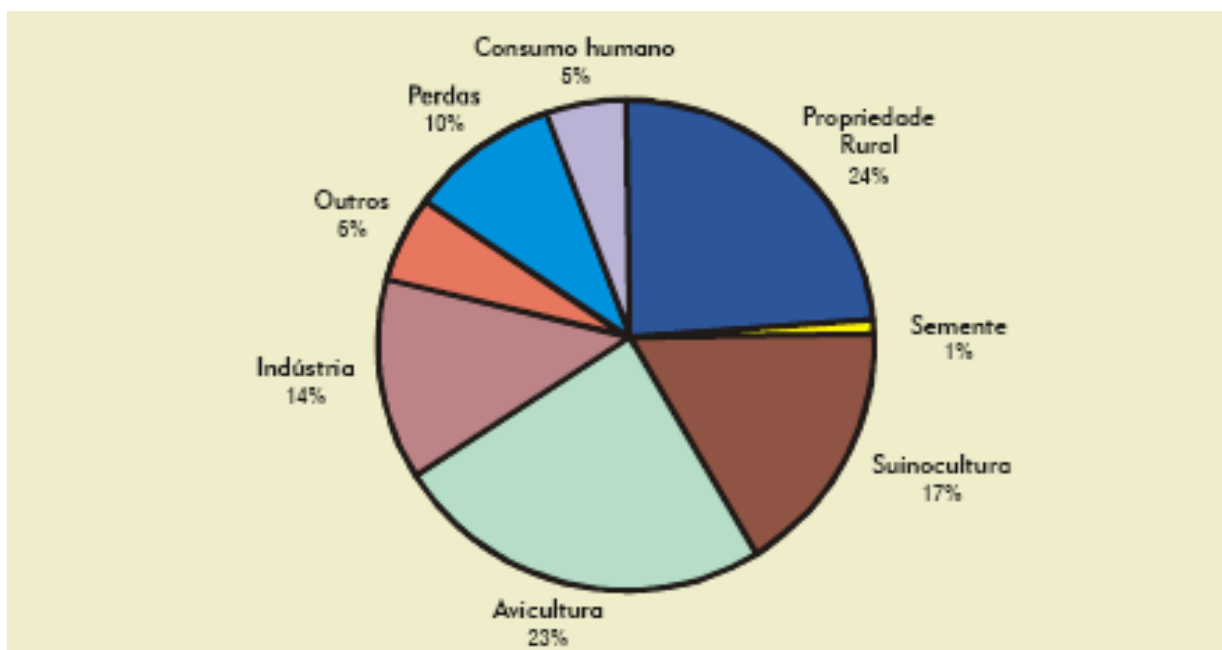


GRÁFICO 1 – Demanda do milho segundo atividades intermediárias ou consumo final – Brasil

FONTE: PONCIANO; SOUZA; REZENDE, 2003.

Segundo Ponciano; Souza e Rezende, em 2003 mais de 60% da produção foi comercializada fora da propriedade e o restante foi consumido nas próprias propriedades rurais. Nota-se também que no Brasil, apenas uma parcela da produção está destinada ao processamento, apesar das múltiplas aplicações nos diferentes segmentos (Tabela 2).

TABELA 2: Exemplos da utilização do milho em diferentes segmentos – Brasil

SEGMENTO	UTILIZAÇÃO
Uso animal direto	Silagem, grãos (ínteiros e desintegrados)
Indústria de rações	Aves (corte ou postura), suínos, bovinos (corte e leite)
Xarope de glucose	Balas, salsichas, mortadelas, hambúrgueres, frutas cristalizadas, compotas, biscoitos, xaropes, sorvetes, polimento de arroz.
Uso humano direto de preparo caseiro	Pamonha, espiga, pipoca, pães, bolos, broas, cuscuz, polenta, angus, sopas, farofa.
Indústria de alimentos - produtos finais	Amidos, fubás, farinhas comuns, canjica, canjiquinha, óleo, creme, glicose, dextrose.
Xarope de glucose com alto teor de maltose	Cerveja
Maltodextrina	Aromas e essências, sopas desidratadas, pó para sorvetes, complexos vitamínicos, produtos achocolatados.
Intermediários	Sêmola, semolina, moído, granulado, farelo de germe.
Corante caramelo	Refrigerantes, cervejas, bebidas alcoólicas, molhos.
Dextrina	Adesivos, tubos e tubetes, barricas de fibra, lixas, sacos de papel, multifoliados, abrasivos, estampagem de tecidos, cartonagem, beneficiamento de minérios.
Amido alimentício	Biscoitos, pó para pudins, fermento em pó, macarrão, produtos farmacêuticos, balas de goma.
Amido industrial	Papel, papelão ondulado, adesivos, fitas gomadas, briquetes de carvão, engomagem de tecidos, beneficiamento de minérios.
Ingrediente protéico	Rações para bovinos, suínos, aves e cães.
Pré-gelatinização	Fundição de peças e metal.
Pré-gelatinização	Alimentos, rotulagem de garrafas e latas, sacos, tubos e tubetes, fechamento de caixas de papelão, colagem de papel, madeira e tecidos.

FONTE: PONCIANO; SOUZA; REZENDE, 2003.

O cultivo do milho assume novas perspectivas, absorção de novas tecnologias, permitindo um aumento na produção, na produtividade e a mudança do perfil de consumo *in natura* para formas mais elaboradas. A tendência é de crescimento na qualidade do produto, mediante maior integração com a agroindústria. (PONCIANO; SOUZA; REZENDE, 2003).

3.2.1 A Cultura do Milho ao Longo do Tempo

Os possíveis locais da origem do milho domesticado, vão de áreas do Paraguai até a Colômbia, assim como na Guatemala e no México. No que a maioria dos pesquisadores concorda é que o milho constituía o alimento básico das culturas americanas, muitos séculos antes dos europeus chegarem a esse continente (PLANTA PODE TER..., 2002).

Logo depois do descobrimento da América, foi levado para a Europa onde passou a ser plantado em escala comercial e espalhou-se desde a latitude de 58° norte (União Soviética) até 40° sul (Argentina) (DUARTE, 2005).

A cultura de milho no Paraná só a partir do século XX ganhou expressão econômica. A ocupação do Estado teve início com o Ciclo do Ouro, meados do século XVI até final do século XVII, repercutindo na fundação de Paranaguá e Curitiba. Seguiu-se o Ciclo do Tropeirismo, do fim do século XVII até meados do século XIX, repercutindo na ocupação dos campos nativos do Segundo Planalto (Ponta Grossa e Campos Gerais). Em sequência veio o Ciclo da Erva-Mate, com seu apogeu entre 1830 – 1930 e o Ciclo da Madeira, de 1890 a 1945 (MAGALHÃES FILHO, 1972 apud LLANILLO, 1991, p.9).

Segundo o Anuário Brasileiro do Milho (UM GRÃO... 2002), com a expansão, nos anos 80, das áreas de soja no Paraná e no Centro-Oeste, a mecanização da lavoura de milho cresceu muito. Surgiu então a tecnologia de tratamento de sementes e introduziram-se mais incentivos para a correção do solo.

Com o processo de ocupação do Paraná, a área cultivada de milho chegou a representar 76% das lavouras temporárias e quase metade da área total de lavouras em 1950. Entre 1950 – 1990, a produtividade de cultura cresceu de 1400 para 2500kg/ha, enquanto a média nacional cresceu de 1300 a 1900Kg/ha (LLANILLO, 1991).

Na década de 1990, os produtores do Paraná e do Cerrado descobriram a rentabilidade e os benefícios de se plantar milho logo após a soja. Estava então sendo evidenciada, a

safrinha (cultura de inverno), sistema de produção que respondia já em 2002 por 20% da safra anual de milho no Brasil (UM GRÃO... 2002).

Dados do Anuário Brasileiro do Milho (UM GRÃO... 2002) mostraram que em 1992, o ápice da produtividade brasileira de milho era de seis toneladas/ha. Em 2002, esse número cresceu para 10 toneladas/ha em média, nas melhores lavouras.

3.2.2 Produção de Milho: Brasileira, Paranaense e dos Campos Gerais

A importância econômica do milho é caracterizada pelas diversas formas de sua utilização, que vão desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia. O uso do milho em grão como alimentação animal representa a maior parte do consumo desse cereal, isto é, cerca de 70% no mundo. Nos Estados Unidos, cerca de 50% é destinado a esse fim, enquanto que no Brasil varia de 60 a 80%, dependendo da fonte da estimativa e de ano para ano. A alimentação humana com derivados de milho constitui fator importante de uso desse cereal em regiões com baixa renda. No Nordeste do Brasil, o milho é a fonte de energia para a população do semi-árido; outro exemplo está na população mexicana, que tem no milho o ingrediente básico para sua culinária (DUARTE, 2005).

No período 1990-2003, as taxas anuais de crescimento dos principais produtos agrícolas exportados pelo Brasil cresceram e revelaram-se superiores às mundiais. Enquanto a exportação mundial de milho cresceu 2,1% neste período, a do Brasil foi de 53%. Tal avanço posicionou o país nos primeiros lugares do ranking mundial das exportações do agronegócio (JANK; NASSAR; TACHINARDI, 2005).

A produção de milho na região Sul do Brasil teve um aumento de 50% a partir do ano de 1992. Nesse período, deu-se a liberalização das importações e do comércio interno de trigo, cereal este, que teve uma grande queda da produção nacional nos anos 90. Considerou-se a possibilidade de que esse aumento na produção de milho no Sul se devesse ao cultivo de

milho como cultura de inverno (*safrinha*), em substituição ao trigo (HELFAND; REZENDE, 1999).

O Brasil ocupava em 2003 o terceiro lugar na produção mundial de milho (6%), ficando atrás dos Estados Unidos que liderava com 40% e da China com 20%. A produção nacional nesse mesmo ano foi de 37 milhões de toneladas e destinada praticamente toda ao mercado interno (PONCIANO; SOUZA; REZENDE, 2003).

As regiões Sul e Sudeste, em 2002 foram responsáveis por 80% da produção de milho no país. O Estado do Paraná, principal produtor nacional desse grão, participou com aproximadamente 22% desse total (FARIAS et al., 2000). Em 2006, a região Sul teve 48,2% de participação na produção de milho no Brasil, apenas na primeira safra. Deste total, 24,6% do Paraná, 14,4% do Rio grande do Sul e 9,2% de Santa Catarina. Na segunda safra, a participação foi de 31,3% da região Sul, provenientes do estado do Paraná. O que indica que o Paraná é o maior produtor de milho no Brasil e em segundo lugar vem o Rio Grande do Sul, seguido de Minas Gerais e de São Paulo (ESTATÍSTICA DA PRODUÇÃO... 2007). O estado de São Paulo também importa milho do Paraná, juntamente com outros estados do Sul (LOPES, 2006).

Com relação a 2005, no ano de 2006, a produção de milho no país, teve um aumento em janeiro, fevereiro e março de 22,11%, 9,81% e 8,87% respectivamente (CONFRONTO DAS SAFRAS...2006).

Um prognóstico para 2006, feito pelo IBGE em 2005 para a segunda safra de milho no Brasil, foi de 8.813.575 toneladas sendo que como resultado real foram colhidas 11.046.437 toneladas, o que significa 2.232.862 toneladas a mais que o esperado, ou seja, um aumento de 25,33%. O prognóstico para segunda safra de 2007, já foi elaborado pelo IBGE, e é de 12.219.438 toneladas (PROGNÓSTICO DA PRODUÇÃO... 2005; PRODUÇÃO DE CEREAIS... 2007).

A estimativa de safra para este ano (2007) no Brasil, segundo o Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA), apurou variação positiva, em relação a 2006, para o milho em grão na primeira safra (14,3%) e milho em grão na segunda safra (20,0%). O milho, tanto na primeira safra quanto na segunda apresentou variação positiva entre janeiro e fevereiro, sendo de 1,2% e 8,5% respectivamente. Estima-se uma produção de 36,0 milhões de toneladas para a primeira safra e 13,2 milhões de toneladas para a segunda (PREVISÃO SAFRA... 2007).

Segundo dados do IBGE (2007), a soja e o milho primeira safra são os que apresentam maiores áreas plantadas, com 20,7 e 9,4 milhões de hectares, respectivamente, cultivados em 2007 (PREVISÃO SAFRA... 2007).

Além de maior produtor de milho, o Paraná também atua como maior produtor de aves e um dos maiores de suínos, (LOPES, 2006), sendo grande parte da produção de milho destinada à alimentação animal, principalmente na produção de rações ou na forma direta, como uso em silagens de alta qualidade (PONCIANO; SOUZA; REZENDE, 2003)

A expressão "Campos Gerais do Paraná" é definida como uma zona fitogeográfica natural, com campos limpos e matas galerias ou capões isolados de floresta ombrófila mista (floresta de araucária, araucarieto), onde aparece o pinheiro araucária. Nessa definição, a região é ainda limitada à área de ocorrência desta vegetação que a caracteriza situada sobre o Segundo Planalto Paranaense (DICIONÁRIO...2005).

Os Campos Gerais do Paraná são formados pelos seguintes municípios: Arapoti, Campo do Tenente, Cândido de Abreu, Castro, Ipiranga, Jaguariaíva, Ortigueira, Pirai do Sul, Porto Amazonas, Reserva, Telêmaco Borba, Tibagi, Balsa Nova, Campo Largo, Carambeí, Imbau, Ivaí, Lapa, Palmeira, Ponta Grossa, Rio Negro, São José da Boa Vista, Teixeira Soares, Ventania. (DICIONÁRIO... 2005). Para fins deste estudo, foram considerados os

municípios da Figura 2, incluindo o município de Imbituva, citado por Melo (2003) como pertencente aos Campos Gerais do Paraná.



FIGURA 2 – Mapa dos Campos Gerais do Paraná – Divisão Municipal

FONTE: Dicionário..., 2005.

As lavouras foram atingidas por forte estiagem ao final de janeiro de 2005, prejudicando culturas como a soja e milho. Em 2006 o fenômeno ocorreu mais cedo, já no início do mês de janeiro, atingindo o milho, com perdas de até 22% do esperado na primeira safra. Ainda assim, segundo relatório da CONAB, a primeira safra alcançou em torno de 7,60 milhões de toneladas, significando um acréscimo de 17% em relação a 2005. A evolução da produção de milho no Estado está demonstrado no Gráfico 2 (LOPES, 2006).

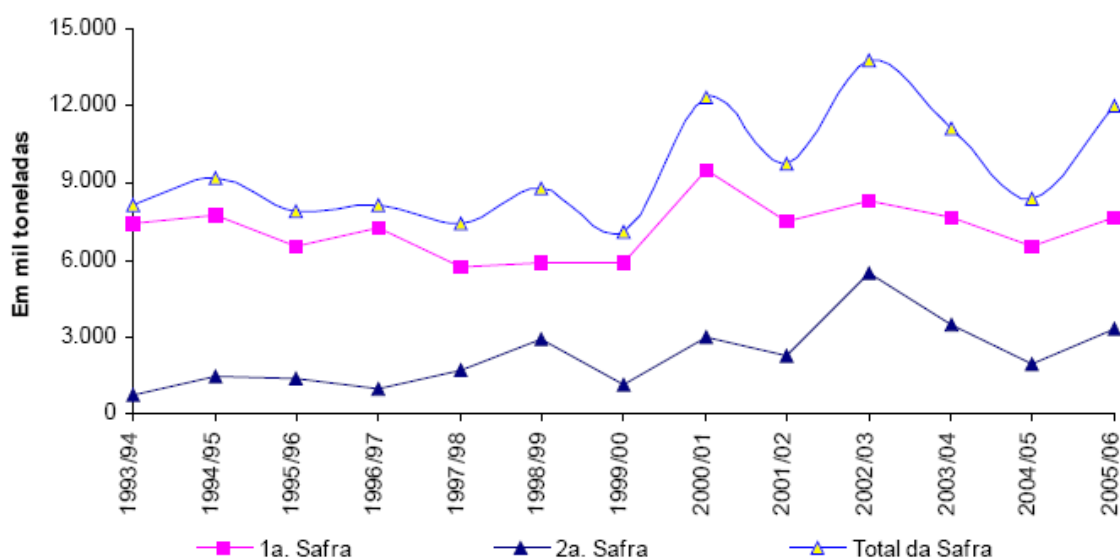


GRÁFICO 2 – Evolução da Produção de Milho no Paraná, Safras 1993/94 a 2005/2006

FONTE: LOPES, 2006.

Alguns fatores influenciam na competitividade do milho brasileiro no processo de comercialização, sendo os principais teores de umidade, níveis de micotoxinas e milho transgênico, perdendo, desta forma, mercado (exportação) para outros países com milho de qualidade superior (PONCIANO; SOUZA; REZENDE, 2003). A utilização de tecnologias e equipamentos adequados à classificação, ao treinamento de classificadores e à inclusão da análise obrigatória de micotoxinas deveriam ser consideradas.

3.3 PROCESSAMENTO DO GRÃO DE MILHO

A indústria de alimentos utiliza como matéria prima diversos derivados do milho, os mais utilizados são fubá, canjica, canjiquinha, óleo, amido, amilose, amilopectina, zeína e fibras (GONÇALVES et al., 2003).

O grão de milho apresenta basicamente três partes: pericarpo, endosperma e embrião. O pericarpo é uma camada fina e resistente, que constitui a parede externa da semente, o pericarpo é rico em fibra, do total de fibra encontrada no grão, 54% está presente no pericarpo. O endosperma é a parte mais volumosa do grão (82% do grão é formado pelo

endosperma), é envolvido pelo pericarpo e constituído de substância de reserva (amido), 98% de amido encontrado no grão. A porção mais externa do endosperma e em contato com o pericarpo, denomina-se de camada de aleurora, esta camada é rica em enzimas que desempenham papel importante na germinação. O embrião encontra-se ao lado do endosperma, e representa 11% do grão de milho e é constituído quase a totalidade dos lipídeos (83%) e dos minerais (78%) do grão, além de conter quantidades importantes de proteínas (26%) e açúcares (70%) (ALESSI, RAUPP, GARDINGO, 2003; PAES, 2006). A Figura 3 mostra o corte longitudinal de um grão de milho demonstrando o endosperma, embrião e pericarpo.

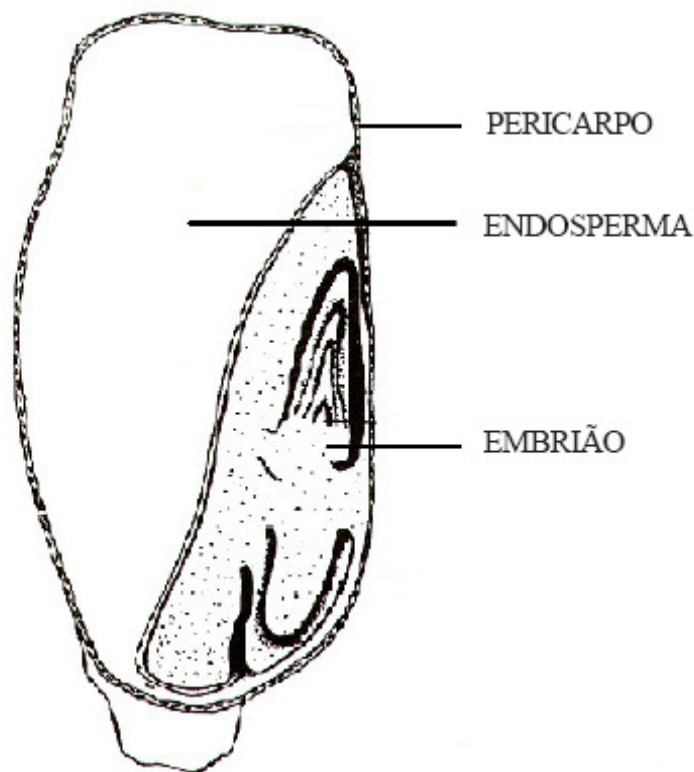


FIGURA 3 – Corte longitudinal do grão de milho

FONTE: ALESSI, RAUPP, GARDINGO, 2003

O uso do grão de milho degerminado e moído, é uma das principais aplicações desse cereal na indústria de alimentos. O grão passa por um processo de secagem, seleção, degerminação e moagem. Como exemplos desse derivado, encontramos a canjica, canjiquinha de milho e também os alimentos extrusados (GONÇALVES et al., 2003).

O milho degerminado, ou também conhecido como endosperma é a canjica, desse subproduto obtém-se a quirera grossa, quirera média e quirera fina, o que diferencia estes produtos é apenas o tamanho das partículas, a granulometria (PENTEADO, 1983).

Além de ser largamente utilizado na alimentação humana, o milho também é o cereal de preferência na alimentação de animais, principalmente como suplementação de pastagem para bovinos. Na época de seca, o milho é utilizado para bovinos na forma de volumoso (silagem), mas principalmente na forma de MDPS (milho desintegrado com palha e sabugo) e como fubá de milho. O fubá de milho nada mais é do que o grão de milho moído, podendo ser encontrado na forma de quirera, que tem as partículas maiores. Nesse processo, não há degerminação, como acontece no processo para consumo humano. Na quirera e no fubá, podem ser encontrados resíduos de palha e sabugo (VALENTE, 1983).

3.4 PADRÕES DE IDENTIDADE E QUALIDADE DO MILHO

O padrão utilizado para milho de consumo humano foi definido pela Portaria n° 85 de 6 de março de 2002 em Anexo XV, do Ministério da Agricultura. O teor de umidade máximo tecnicamente recomendável para conservação e empacotamento do milho é de 14%. Matérias estranhas, impurezas, tecnicamente recomendáveis é de 3%. Segundo o Regulamento Técnico do Milho, aprovado pela Portaria n° 85 do Ministério da Agricultura:

No caso específico do milho que se apresenta com umidade superior a 14%, deverá ser informado claramente, o percentual de umidade encontrado no produto, juntamente com o seu

correspondente prazo de validade para consumo, bem como as restrições para conservação e manuseio.

Segundo o Art. 6º da Portaria nº 845 de 08 de novembro de 1976 do Ministério da Agricultura, o milho que apresentar uma ou mais características abaixo, será desclassificado:

- Mau estado de conservação;
- Aspecto generalizado de mofo e/ou fermentação;
- Resíduos de produtos fitossanitários, teor de micotoxinas ou outros contaminantes ou substâncias nocivas a saúde acima do limite estabelecido pela legislação;
- Odor estranho de qualquer natureza, impróprio do produto;
- Presença de insetos vivos no produto embalado ou empacotado.

O padrão oficial do milho integral e/ou moído para consumo animal é informado pelo Ministério da Agricultura através da Instrução SNA 001/91 (21 de março de 1991), e o grão de milho destinado para consumo animal atendido as características da Portaria 07 de 09.11.88, item 27.1 obtido através de moagem do grão, com a seguinte especificação:

Umidade: 12,50% (máximo)

Proteína Bruta: 8,50% (mínimo)

Extrato etéreo: 3,00% (mínimo)

Fibra Bruta: 1,50% (máximo)

Matéria Mineral: 2,00% (máximo)

Aflatoxinas: 50 ppb (máximo)

De acordo com a Portaria nº 845 de 08 de novembro de 1976 do Ministério da agricultura, o milho é classificado em três tipos:

- Tipo 1: milho seco, são, grãos regulares com umidade máxima 14,5%. Tolerância máxima de 1,5% de impurezas, fragmentos ou matérias estranhas; 11% de grãos avariados, 3% (em peso) o máximo de grãos ardidos e grãos brotados.

- Tipo 2: milho seco, são, grãos regulares e máxima umidade 14,5%. Tolerância máxima de 2% de matérias estranhas, fragmentos e impurezas; 18% grãos avariados, 6% o máximo de grãos ardidos e brotados.
- Tipo 3: milho seco, são, grãos regulares e umidade máxima de 14,5%. Tolerância máxima de matérias estranhas, impurezas e fragmentos 3%; grãos avariados máximo de 27% e 10% grãos ardidos e brotados.

De acordo com a Portaria n° 845 de 08 de novembro de 1976 do Ministério da Agricultura:

Art. 13 - as bases e as normas e os termos usados nas presentes especificações, assim como as características relacionadas com a qualidade do milho, deverão ser observadas e interpretadas do seguinte modo:

Grãos ardidos são os grãos ou pedaços de grãos que perderam a coloração ou cor característica, por ação do calor e umidade ou fermentação em mais de $\frac{1}{4}$ (um quarto) do tamanho do grão.

Grãos Avariados são considerados os grãos ou pedaços de grãos, grãos chochos, e imaturos os atacados por animais roedores e parasitas, os fermentados até $\frac{1}{4}$ (um quarto) do tamanho do grão bem como os prejudicados por diferentes causas.

Grãos Brotados são os grãos ou pedaços de grãos que apresentarem germinação visível.

(...)

Matérias Estranhas são consideradas os grãos ou semente de outras espécies, bem como os detritos vegetais, sujidades e corpos estranhos de qualquer natureza, não oriundos do produto.

Segundo Pires e outros autores (1998), a quirera ou canjiquinha de milho, é um subproduto, proveniente do beneficiamento industrial do grão de milho. É composta em sua maior parte de milho quebrado, contendo certa quantidade da parte embrionária, palha, sabugo além de sementes de plantas invasoras, podendo variar de 6 a 12% seu teor de proteína bruta. Entretanto, a quirera é obtida com teor de umidade próximo a 25%, necessitando de secagem ou conservação com tratamentos químicos, para que não ocorra perda deste material, uma vez que pode ser fornecida como parte da ração na alimentação de animais.

3.5 VARIEDADES DE MILHO RESISTENTES ÀS CONTAMINAÇÕES POR FUNGOS

Segundo o Anuário Brasileiro do Milho, com o milho geneticamente modificado, o teor de micotoxinas é reduzido. As variedades Bt são resistentes a insetos, as lagartas (insetos) atacam a espiga, permitindo a penetração do fungo produtor de micotoxina. O controle a essas lagartas é muito mais eficiente no milho geneticamente modificado, permitindo que se colha um produto de maior qualidade (O MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO E... 2002).

O Milho BRS 3151 é um milho híbrido, desenvolvido pela Embrapa Milho e Sorgo, tem ciclo precoce, espigas longas e bem empalhadas e ótima sanidade de grãos. Indicado especialmente para as regiões Centro-Oeste, Sudeste e norte do Paraná e para os estados da Bahia, Piauí, Maranhão e Tocantins. Outra característica desse híbrido é a sua boa resistência ao acamamento e ao quebramento, o que indica que é mais resistente a fungos que penetram no grão através do quebramento destes (MILHO BRS 3151..., 2005).

Outro milho desenvolvido pela Embrapa é o Milho BR 3123 (híbrido triplo). Este híbrido é de ciclo precoce, com ampla adaptação a diferentes regiões do Brasil. Possui sistema radicular profundo e excelente tolerância ao acamamento e ao quebramento sendo mais difícil a contaminação pelos fungos produtores de micotoxinas. Todas as variedades de milho estão ainda sendo testadas, pois não há variedade de milho totalmente resistente a fungos (MILHO BR 3123..., 2005).

3.6 CONDIÇÕES PARA DESENVOLVIMENTO DO FUNGO E PRODUÇÃO DE MICOTOXINA

A produção de micotoxinas pelos fungos depende de fatores ambientais (SERRA, 2005). O inóculo de fungos micotoxigênicos pode ter origem no ar, solo, vegetação em decomposição, plantas infectadas ou insetos. Em condições favoráveis, estes fungos

competem com outros organismos do solo e produzem inóculos abundantes cujos níveis variam com a época e os locais (PAYNE, 1998 apud SERRA, 2005, p. 32).

A presença de fungos micotoxigênicos é um dos pré-requisitos para que haja produção de micotoxinas em produtos agrícolas, mas não implica na sua produção. Para produzir micotoxinas numa dada planta, o fungo toxigênico tem que colonizar e infectar a planta e também produzir a micotoxina nos tecidos do hospedeiro (SERRA, 2005).

A presença de micotoxinas em grãos e rações, cujo tipo ou estrutura química depende do desenvolvimento de linhagens fúngicas específicas, está sujeita à influência de fatores ambientais como umidade do substrato e temperatura ambiente. Portanto, a contaminação de rações e outros alimentos por micotoxinas pode variar de acordo com as condições ambientais, métodos de processamento ou produção e armazenamento. Vai também depender do tipo alimento, já que alguns grãos são substratos mais aptos que outros para o crescimento de determinados fungos (SANTURIO, 2000).

A severidade da infecção depende da patogenicidade da estirpe, susceptibilidade da cultura, e de fatores ambientais. Existem fungos micotoxigênicos que são patogênicos para plantas (espécies de *Fusarium*). Porém, em geral, não são agressivos, mas essencialmente saprófitas ou parasitas oportunistas como as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* (SMART; WICKLOW e CALDWELL, 1990).

Existem nas plantas vias naturais de entrada que apresentam pouca obstrução física à contaminação, porém algumas variedades mostram-se mais resistentes que outras à infecção por fungos micotoxigênicos (WIDSTROM, 1992 apud SERRA, 2005, p. 34). Durante as etapas do desenvolvimento, a planta apresenta susceptibilidade diferente a fungos, por isso, fatores relacionados com a colheita são essenciais no estabelecimento da contaminação. Regra geral, quanto mais tarde for feita a colheita, mais tempo existe para o desenvolvimento de micotoxinas no campo e mais susceptível a cultura se torna. No momento da colheita, ocorrem danos à planta, podendo abrir vias de entrada para fungos micotoxigênicos (SERRA, 2005).

Como têm capacidades parasíticas limitadas, várias condições ambientais têm de ocorrer para que se dê a infecção e a síntese de micotoxinas (SMART; WICKLOW e CALDWELL, 1990).

Danos físicos na planta ocasionados por insetos ou pássaros ou pela presença de outros fungos ou ainda por fatores climáticos (granizo, seca ou chuva excessiva), propiciam o ataque de fungos e outros invasores, e aumentam a susceptibilidade da planta em qualquer estado de maturação. Mas além dos danos físicos, outros aspectos, durante o cultivo, contribuem para a susceptibilidade a infecções. Excesso de chuvas em momentos críticos do ciclo de vida da planta pode ser determinante (BILGRAMI e CHOUDHARY, 1998 apud SERRA, 2005, p. 34).

Danos mecânicos favorecem a absorção de umidade, facilitando a invasão e penetração do fungo, levando ao rápido desenvolvimento e produção de toxinas, pois ocorre quebra de grãos alterando ou eliminando a cutícula do grão de milho, que serve de barreira natural contra a contaminação fúngica (SCUSSEL, 1998). Na Figura 4 pode-se observar grãos de milho danificados e com presença de fungos.



FIGURA 4 – Grãos de milho danificados e com presença de fungos

A distribuição mundial e a incidência das espécies de fungos varia de acordo com fatores bioclimáticos (ARNOLDS, 1997 apud SERRA, 2005, p. 31). Os fatores ambientais são determinantes na produção de micotoxinas, influenciando na quantidade do inóculo, e na capacidade de colonização do fungo e de infectar e produzir micotoxinas na planta, além de contribuírem para a susceptibilidade do hospedeiro. Os fatores climáticos mais relevantes para a produção de micotoxinas em campo são a temperatura, a precipitação e a umidade (ABRAMSON, 1998). A chuva e o vento facilitam a dispersão de inóculo. A capacidade de germinação dos esporos depende essencialmente da temperatura e da umidade ou atividade de água do substrato e, se as condições climáticas forem favoráveis, dá-se à germinação dos esporos e a colonização das plantas, o que pode conduzir à infecção e à formação de micotoxinas (BHATNAGAR, LILLEHOJ e ARORA 1992).

Após a infecção, o fungo produz a micotoxina cumulativamente, até que o substrato seja esgotado ou que se estabeleçam condições permanentemente desfavoráveis para a síntese de micotoxinas (SERRA, 2005).

Segundo Lazzari; Márcia (1998), os fatores que afetam o crescimento de fungos nos grãos de milho incluem: teor de umidade dos grãos, temperatura, tempo, condição física e sanitária do grão, nível de inoculação do fungo, conteúdo de oxigênio e armazenamento anterior, insetos e ácaros. A invasão de um lote de grãos por insetos pode iniciar ou agravar o desenvolvimento de fungos, pois através de sua atividade metabólica há um aumento de teor de umidade e temperatura da massa dos grãos.

O teor de umidade, nos períodos de crescimento e colheita, é fator fundamental para infestação fúngica em culturas de campo e no acúmulo de micotoxinas nos ingredientes das rações (MICOTOXINAS, ESPECIAL... 2004).

Durante o armazenamento e transporte, os fungos micotoxigênicos que se instalaram durante o plantio e colheita continuam presentes. Podem também existir outras fontes de

contaminação (outros produtos armazenados, instalações de armazenamento ou transporte). O ambiente na armazenagem é mais seco que no campo, e as atividades de água do substrato mais baixas, o que favorece o crescimento de fungos com requisitos ecológicos diferentes das condições antes da colheita. Nesta fase, a produção de micotoxinas depende da presença de fungos toxigênicos capazes de crescer e produzir a micotoxina no substrato e de fatores ambientais no armazenamento, dos quais a atividade de água é particularmente importante. Outros fatores, como o tempo de incubação, a temperatura, a atmosfera e o potencial redox, bem como pH e outros microorganismos são relevantes (ABRAMSON, 1998 apud SERRA, 2005, p. 35; SMITH et al., 1998 apud SERRA, 2005, p.35).

Os fungos que contaminam sementes e grãos em geral são freqüentemente divididos em dois grupos: fungos do campo e fungos de armazenamento, que invadem o milho pouco antes e durante o armazenamento. A distinção é baseada nas condições ambientais e/ou ecológicas que favorecem o crescimento dos mesmos. Também não é absoluta, pois é baseada nos seus hábitos de crescimento e onde os danos ocorrem. Os fungos do campo requerem um teor de umidade em equilíbrio com uma umidade relativa de 90-100% para crescerem, ou seja, crescem em elevada atividade de água (acima de 0,90). Os principais gêneros são *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Nigrospora*, *Helminthosporium*, *Alternaria* e *Cladosporium* que invadem grãos e sementes durante o amadurecimento e o dano é causado antes na colheita. Esses fungos não se desenvolvem normalmente durante o armazenamento, exceto em milho armazenado com alto teor de umidade (LAZZARI; MÁRCIA, 1998; SERRA, 2005). Já os fungos de armazenamento crescem em baixas atividades de água, (comum em cereais). Os principais gêneros são *Aspergillus* e *Penicillium*, apesar dos fungos de armazenamento também estarem presentes no campo, onde podem infectar as colheitas (*Aspergillus flavus*) e produzir a micotoxina. As condições de atividade de água e de

temperatura para o desenvolvimento dos fungos estão demonstradas no Gráfico 3 (SERRA, 2005).

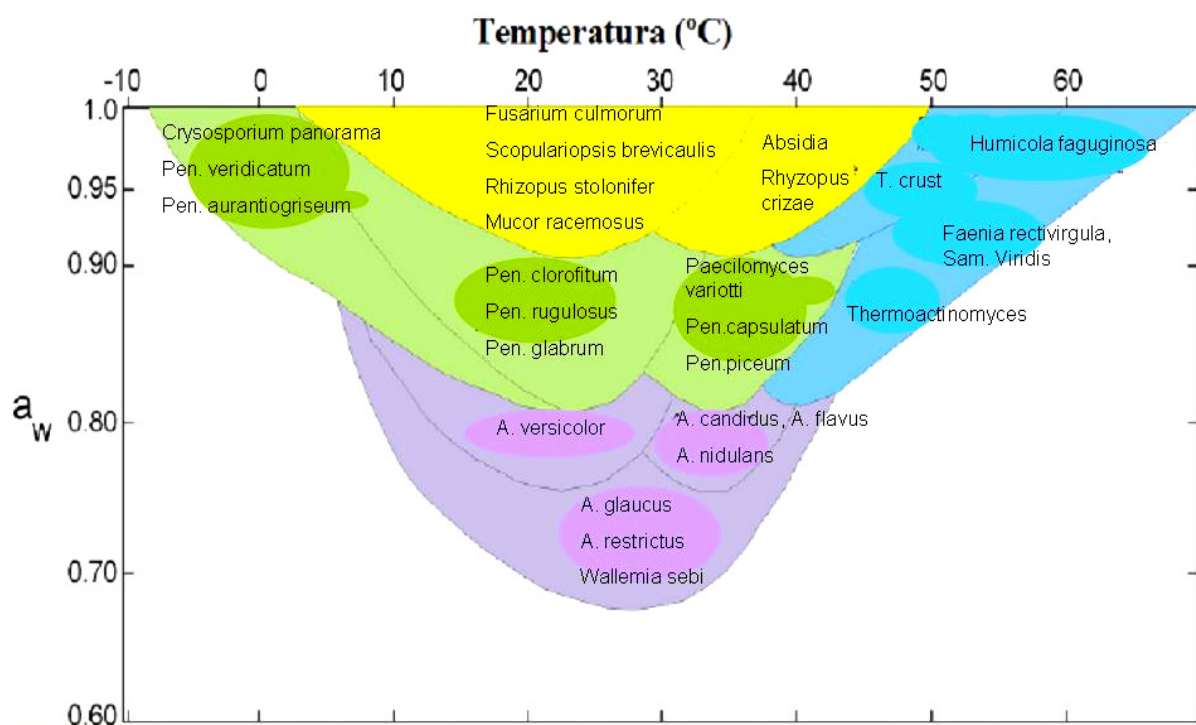


GRÁFICO 3 - Condições de atividade de água e temperatura para desenvolvimento dos fungos

FONTE: SERRA, 2005.

Os fungos do gênero *Aspergillus* e os do gênero *Penicillium* são os indicadores de deterioração em sementes e grãos causando danos no embrião, descoloração, alterações nutricionais, perda da matéria seca e os primeiros estágios da deterioração microbiológica (LAZZARI; MÁRCIA, 1998).

As espécies do gênero *Aspergillus* são na maioria saprófitas ou patogênicos oportunistas de plantas, capazes de crescer até em baixas atividades de água e com temperaturas elevadas, dominando ambientes quentes e/ou secos (SERRA, 2005). O crescimento de *Aspergillus flavus* depende do teor de água dos grãos em equilíbrio com a umidade relativa do ar, sendo que a temperatura determina a velocidade de crescimento. Mantendo-se baixa a umidade relativa do ar no local de armazenamento, pode-se reduzir ou

até mesmo evitar a formação de aflatoxina (DHINGRA; COELHO NETTO, 1998). São mais freqüentes em climas tropicais que em climas temperados e é nos trópicos que dominam a microflora dos alimentos e que são responsáveis pela produção de micotoxinas em diversos produtos agrícolas, como cereais, amendoim, cacau, café. As espécies de *Aspergillus* regra geral crescem mais rápido que os *Penicillium*, apesar de tardarem mais a esporular. Os seus esporos são resistentes à radiação solar e a agentes químicos (PITT E HOCKING, 1997).

3.7 CONTAMINAÇÃO DOS ALIMENTOS POR MICOTOXINAS

A contaminação dos alimentos por micotoxinas resulta da infecção da cultura/alimento por fungos toxigênicos, freqüentemente sem sintomas visíveis a olho nu (SERRA, 2005). De acordo com Nunes (2004), todo produto estocado contém fungos e/ou seus esporos, mas nem todo fungo ou esporo presente na armazenagem é produtor de micotoxinas patogênicas. Tal ocorrência dependerá das condições em que a armazenagem for realizada: “Por melhores que sejam as instalações e condições de armazenagem sempre existirão fatores de risco”. Serra (2005), afirma ainda que nem todas as estirpes de uma dada espécie são capazes de produzir micotoxinas. No caso da espécie produtora de aflatoxinas, *A. flavus*, as estirpes não toxigênicas são mais freqüentes que as toxigênicas.

3.8 PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS NOS ALIMENTOS

A produção de micotoxinas pode ocorrer ao longo de fases distintas da produção dos alimentos. Na Figura 5 pode-se observar um esquema genérico da produção de alimentos até chegarem ao consumo humano (SERRA, 2005).

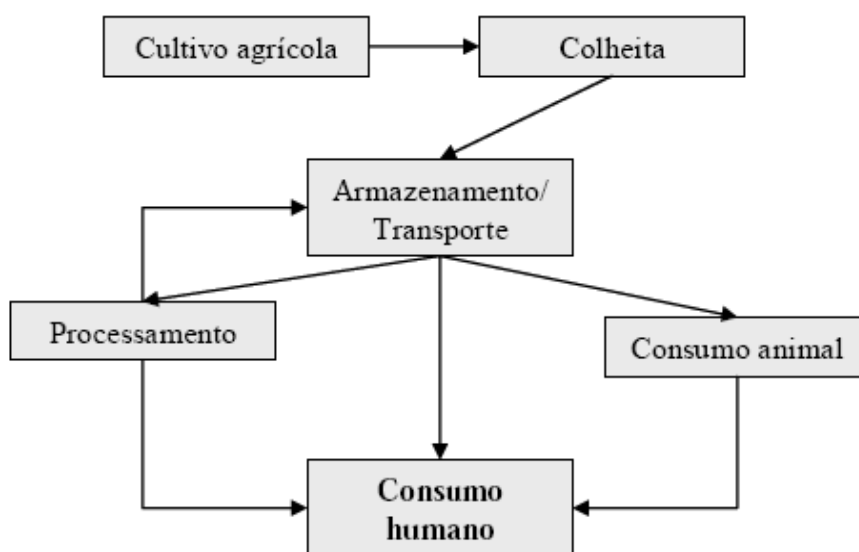


FIGURA 5 - Diagrama representativo das fases de produção de alimentos até consumo humano

FONTE: SERRA, 2005

Os fungos toxigênicos podem estar presentes durante o cultivo, colheita, armazenamento, transporte e processamento dos alimentos. Quando a planta é infectada no campo, o crescimento fúngico pode continuar nos estados pós-colheita e armazenamento (SERRA, 2005). De acordo com Lazzari (1997), o processo de infecção de sementes e grãos pelos fungos, geralmente, começa no campo, durante maturação e ainda durante a colheita, secagem, armazenagem, transporte e processamento.

Segundo Molin (1999), a síntese de micotoxinas pode ocorrer ainda no campo, antes da colheita, não havendo processos, isolados, eficientes de caráter técnico e econômico para a descontaminação do produto. Quando a síntese das micotoxinas não ocorre até a fase de colheita, o manejo dos produtos é facilitado, favorecendo medidas preventivas para evitar a contaminação a partir da referida fase.

A qualidade do produto estocado como grãos e sementes é responsabilidade dos armazenadores. Falta de cuidados na armazenagem, podem trazer danos, degradação da qualidade de grãos e sementes pela atividade fúngica, como perda do poder germinativo, descoloração. A seguir percebe-se a presença do mofo ou bolor, seguido de odor de mofado

ou azedo, perda de matéria seca e finalmente perda de valor nutritivo. A qualidade física, sanitária e nutricional dos grãos deve ser mantida, através de cuidados na armazenagem (LAZZARI, 1997).

3.9 MICOTOXINAS E SAÚDE HUMANA E ANIMAL

As micotoxinas podem afetar muitos órgãos e sistemas, principalmente o fígado, rins e sistemas nervoso, endócrino e imunológico (SERRA, 2005). Segundo Lazzari (1997), quando ingeridas pelo homem ou pelos animais, podem causar doenças denominadas micotoxicoses. Três tipos de fungos podem causar micotoxicoses: macroscópicos (cogumelos tóxicos); parasitas (infestam plantas no campo); de armazenamento (crescem em grãos e sementes durante o armazenamento em condições de umidade favoráveis podendo produzir micotoxinas). A principal via de exposição dos animais é através da ingestão de alimentos contaminados (SERRA, 2005). Um dos graves problemas que ocorrem em alimentos contaminados é que quando os sinais de micotoxicoses tornam-se aparentes, o produto contaminado já foi totalmente consumido (LAZZARI, 1997).

As aflatoxinas podem ser encontradas em praticamente todos os grãos e cereais utilizados para consumo humano ou animal (rações), causando inibição da síntese protéica e queda do nível de proteínas plasmáticas nos animais (AVES - MICOTOXICOSES..., 2005).

A Tabela 3 mostra alguns alimentos destinados à alimentação humana em que foram detectadas micotoxinas e seus efeitos tóxicos.

TABELA 3 – Alimentos destinados à alimentação humana em que foram detectadas micotoxinas e seus efeitos tóxicos

<i>Micotoxina</i>	<i>Ocorrência em Alimentos</i>	<i>Efeitos patológicos causados pela micotoxina</i>
Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2)	Amendoim, milho, trigo, arroz, algodão, nozes, leite, ovos, queijo, figos, alimentos variados	Hepatotoxicidade; hiperplasia dos dutos biliares; hemorragia renal e do trato intestinal; carcinogênese (tumores no fígado)
Aflatoxina M1	Leite	Semelhante a aflatoxina B1
Citrinina	Trigo, cevada, milho e arroz	Nefrotoxicidade (necrose tubular do rim); nefropatia
Ácido ciclopiazônico	Milho, amendoim, queijo	Necrose muscular; hemorragia intestinal e edema; lesões orais
OTA	Cereais (trigo, cevada, aveia e milho), feijão desidratado, amendoim com bolor, queijo, café, passas, uvas, frutos secos, vinho	Nefrotoxicidade (necrose tubular do rim); nefropatia; danos no fígado; enterite; teratogênese; carcinogênese (tumores renais e do trato urinário); imunossupressão
Patulina	Maçã, suco de maçã	Edema cerebral e pulmões; hemorragia pulmonar; danos nos capilares do fígado, baço e rins; paralisia dos nervos motores; convulsões; carcinogênese (não confirmada); antibiótico
Ácido penicílico	Milho armazenado, cereais, feijão desidratado, tabaco com bolor	Danos no fígado (fígado inchado, necrose celular); danos renais; ação tipo digitalis no coração; dilatação dos vasos sanguíneos; antidiurético; edema em pele de coelho; carcinogênese e antibiótico
Penitrininas	Queijo em creme com bolor, nozes inglesas, hamburguer, cerveja	Tremores; morte; descoordenação; diarreia com sangue
Esterigmatocistina	Café verde, trigo com bolor, queijos duros, ervilhas, algodão	Carcinogênese; hepatotoxicidade
Tricotecenos (toxina T-2, diacetoxiscirpenol, neosolaniol, nivalenol, diacetilnivalenos, DON, toxina HT-2, fusarenona X)	Milho, trigo, cevada, aveia	Perturbações digestivas (diarreia, recusa de alimentos); hemorragias (estômago, coração, intestinos, pulmões, bexiga e rins); edema; lesões orais; dermatite; desordem sangüíneas (leucopenia)
Zearalenona	Milho	Efeitos estrogênicos (edema da vulva, prolapso da vagina, alargamento do útero); atrofia dos testículos; atrofia dos ovários; aumento das glândulas mamárias; aborto
Fumonisininas	Milho e derivados, chá preto	Leucoencefalomalacia e edema pulmonar; carcinogênese (câncer do esôfago)

FONTE: CAST, 2003

Segundo Lazzari (1997), as aflatoxinas causam danos à saúde, pois são carcinogênicas, teratogênicas e mutagênicas. O consumo contínuo, de pequenas porções pode resultar em câncer hepático. O ataque a esse órgão altera a absorção de lipídeos, vitaminas e minerais; afeta também o metabolismo e causa depressão do sistema imunológico, deixando os organismos mais vulneráveis a bactérias, vírus e protozoários. De acordo com Gourama e Bullerman (1995, apud MOLIN, 1999, p.4), a aflatoxina B₁ possui o mais alto grau de potencial carcinogênico para o homem e o maior grau de toxicidade para animais, seguida da, G₁, B₂ e G₂, pode-se observar suas estruturas na Figura 6.

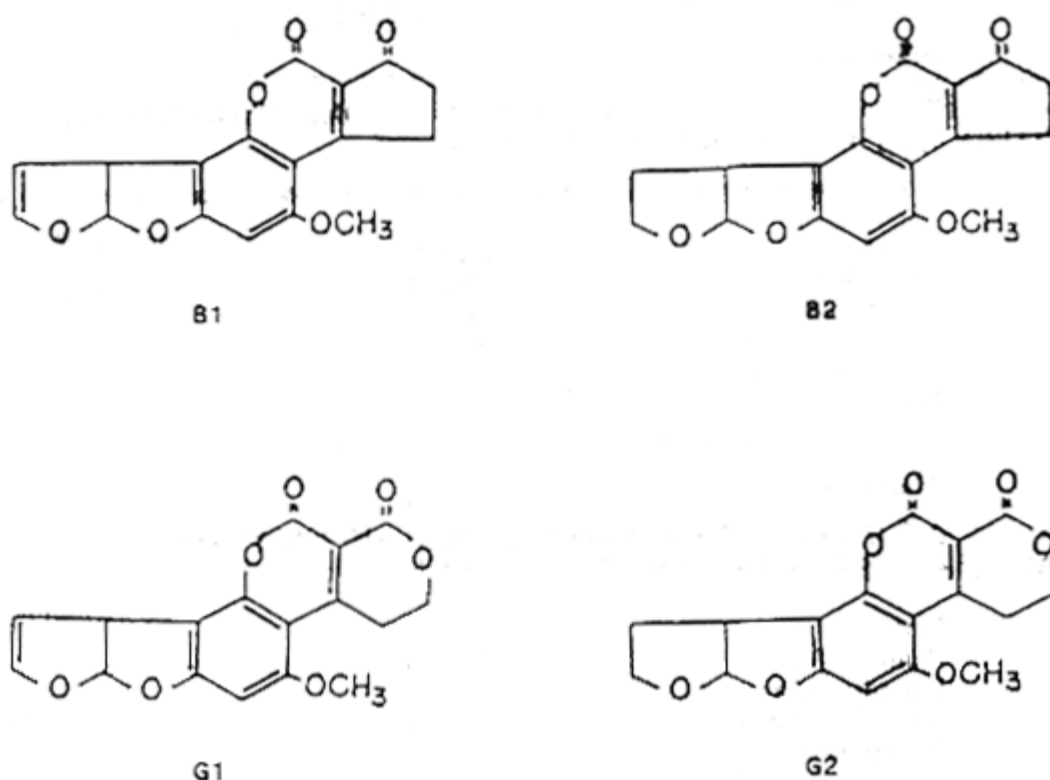


FIGURA 6 – Estrutura da Aflatoxina B₁, B₂, G₁ e G₂.

FONTE: CASTRO, AHUMADA, 2007.

“Estima-se que cerca de 35% dos casos de câncer humano estejam diretamente relacionados à dieta, e a presença de aflatoxinas em alimentos é considerada um fator importante na produção de câncer hepático, principalmente em países tropicais” (CALDAS; OLIVEIRA; SILVA, 2002).

A relação de aflatoxina com a incidência da hepatocarcinoma e do “Kwashiorkor” (estado grave de desnutrição) já está comprovada, dependendo da quantidade e frequência da ingestão de produtos contaminados. A OMS (Organização Mundial da Saúde) já concluiu que a aflatoxina pode causar câncer primário no fígado do homem (FONSECA, 2003).

A importância da resposta às micotoxinas depende diretamente do tipo presente e do nível de contaminação (AVES - MICOTOXICOSES..., 2005). A exposição prolongada a níveis baixos de micotoxinas pode levar a manifestações como imunidade debilitada, atrasos no crescimento, susceptibilidade a doenças, como também pode levar a problemas crônicos de saúde ou até a morte quando presentes em níveis elevados na dieta alimentar (SERRA, 2005).

Segundo Santurio (1999), não se tem dados precisos sobre a absorção de Zearalenona pelo sistema digestivo, mas ela parece ser metabolizada no fígado sendo biotransformada em β -zearalenol e α -zearalenol. A enzima que catalisa a redução de zearalenona para zearalenol é a 3- α -hidroxi-esteróide-desidrogenase, conhecida por degradar a 5- α -androstam-3,17-diona, um produto do metabolismo dos esteróides. Portanto, a zearalenona ou seus metabólitos, interage com os receptores estrogênicos, como consequência verifica-se alterações na atividade secretória do endométrio e, por conseguinte, no tamanho do lúmen uterino.

O mecanismo de ação da toxina indica que, entrando no núcleo da célula hepática, une-se ao DNA inibindo a RNA-polimerase, reduzindo a síntese do RNA-mensageiro, sendo sua inibição verificada em 15 minutos, pela redução da síntese protéica. Portanto, as aflatoxinas atuam no metabolismo animal modificando vários mecanismos de regulação

metabólica e celulares de defesa. A aflatoxicose produz manifestações clínicas como depressão, ataxia e morte entre 10 e 14 dias após a ingestão (VILAR et al., 2003).

As aflatoxinas são inicialmente encontradas nos grãos como cereais, oleaginosas e também produtos derivados destes. Devido à alta ingestão desses substratos na dieta dos animais de criação como eqüinos, bovinos, suínos e aves, estudos têm sido feitos a respeito do adverso na saúde animal e produtividade quando a ração contaminada com micotoxina é/foi consumida (AVES - MICOTOXICOSES..., 2005).

De acordo com Lazzari (1997), frangos alimentados com ração contaminada com aflatoxina, ganharam menos peso quando comparados com frangos alimentados com ração normal e apresentaram lesões hepáticas características de intoxicação por aflatoxina.

A Figura 7, mostra o efeito da aflatoxina no crescimento de frangos, a ração contaminada retardou o crescimento (MALMANN, 2004).



T1 – controle

T2 – 3ppm aflatoxina

FIGURA 7 – Efeito da Aflatoxina no crescimento de frangos (ambos com 21 dias).

FONTE: MALMANN, 2004

Os sintomas característicos das micotoxicoses nos animais são manifestações de efeitos das micotoxinas no processo metabólico dos mesmos. Os efeitos mais comuns são: amarelamento e aumento do fígado, rins inchados, lesões orais, desequilíbrio das funções imunológicas aumento da susceptibilidade a lesões de pele, diminuição na produção de ovos e peso do ovo, diminuição da estabilidade óssea, aumento da fragilidade intestinal, redução da pigmentação, inibição da absorção de nutrientes, redução na taxa de crescimento (AVES - MICOTOXICOSES..., 2005).

A Aflatoxina age diretamente no fígado (Figura 8), a Zearalenona atinge o aparelho reprodutivo sendo que a interação de micotoxinas é muito mais violenta nas aves do que em outros animais (AVES - MICOTOXICOSES..., 2005). Em aves poedeiras, ocorre a redução na produção e qualidade dos ovos, inclusive, aumento de manchas de sangue na gema do ovo, devido à alimentação estar contaminada com micotoxinas (MICOTOXINAS, ESPECIAL... 2004). Altos índices representam alta mortalidade, porém frequência de baixo nível de contaminação representa ao longo do tempo, baixo rendimento da granja (AVES - MICOTOXICOSES..., 2005).

Na Figura 8, a diferença notória de fígado sadio e fígado contaminado por aflatoxina. Os frangos foram alimentados durante 42 dias com ração controle e ração contaminada por aflatoxina (MALMANN, 2004).



FIGURA 8 – Efeito da aflatoxina em fígado de frango.

FONTE: MALMANN, 2004

Os efeitos mais comuns da contaminação por micotoxinas em peixes são: amarelamento e aumento do fígado, redução na taxa de crescimento, inibição da absorção de nutrientes, aumento da fragilidade intestinal, desequilíbrio das funções imunológicas, hemorragias (PEIXES - MICOTOXICOSES..., 2005).

Em eqüinos, as atividades mais encontradas e de maior incidência estão na Fumonisina e na Aflatoxina, e em menor escala a Zearalenona (EQÜINOS – MICOTOXICOSES..., 2005).

Os efeitos das micotoxinas são cumulativos em bovinos, sendo que os primeiros sintomas são observados num período de 3 a 9 meses. Os animais mantidos com silagens como forma de ração e/ou sistemas de pastagens, apresentam quadros bem distintos de micotoxicoses. As micotoxinas mais observadas em bovinos são: Aflatoxina (afeta na produção, no leite, fígado, podendo causar morte), Zearalenona (afeta a reprodução, pigmentação e pode causar aborto) (BOVINOS – MICOTOXICOSES..., 2005).

O sistema reprodutivo é altamente estimulado e os sinais de intoxicação crônica manifestam-se gradativamente nos órgãos primários e secundários deste sistema. Em porcas prenhas, ocorre o aborto a partir da primeira semana após a cobertura se houver ingestão de ração contaminada com mais de 10 ppm de zearalenona. Os suínos são os animais mais sensíveis a intoxicação por zearalenona (LAZZARI, 1997). Os sintomas de intoxicação mais característicos são: inflamação do útero, mamas e vulva (causando prolapso vaginal) em fêmeas púberes, atrofia testicular e inflamação das mamas em machos jovens, e em animais adultos, infertilidade.

Outros animais susceptíveis a zearalenona são: gado leiteiro, carneiros, galinhas (causa perda de peso e da produção de casca finas dos ovos), perus (perda de peso), camundongos, porquinhos da Índia e macacos (SCUSSEL, 1998).

A zearalenona interfere no metabolismo protéico, alterando a utilização dos aminoácidos livres ao promover a síntese de proteínas uterinas no lugar das proteínas necessárias para o desenvolvimento do animal, diminuindo a velocidade de crescimento. O peso do útero em valor absoluto e em relação ao peso total do animal, aumenta ao mesmo tempo em que o útero necessita de proteínas. Ao aumentar a quantidade de proteína da ração, os aminoácidos livres competem com a zearalenona pela reabsorção tubular renal, com a qual a toxina é excretada em maiores quantidades (ARROYO, 1986). Na Figura 9, a estrutura química geral da zearalenona.

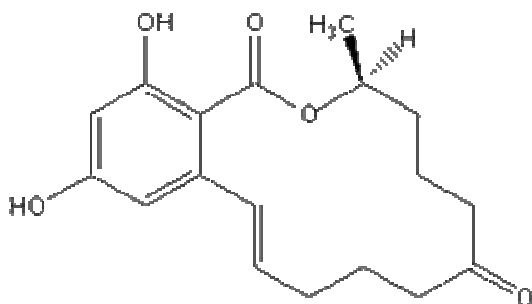


FIGURA 9 – Estrutura química geral da Zearalenona

FONTE: Zearalenona – FTRT, 2007.

3.10 ESTUDOS REALIZADOS EM ALIMENTOS PARA DETECÇÃO DE MICOTOXINAS

Silva et al., (2004), através de estudos com amostras de sorgo (recém-colhido e armazenado), detectaram presença de aflatoxinas (utilizando método de cromatografia em camada delgada). “Sugere-se o controle rigoroso das condições de armazenamento de sorgo, visando minimizar a contaminação por fungos deteriorantes toxígenos, evitando riscos à saúde humana e animal” (SILVA et al., 2004).

Simionato e Sylos (2004) avaliaram o efeito de cozimento sobre teores de aflatoxina e ocratoxina em amostras de arroz polido tipo 1. As amostras foram contaminadas artificialmente com aflatoxina B₁ e ocratoxina A e foram submetidas a três processos de cozimento durante 9 minutos: cozimento normal (50g de arroz em 100mL de água em fogão a gás, cozimento com água de excesso (50g de arroz em 200mL de água em fogão a gás) e cozimento em microondas (50g de arroz em 100mL de água em forno de microondas). Verificaram que a maior redução do teor de aflatoxina B₁ (89,1%) e ocratoxina A (86%) foi no arroz preparado com água em excesso, seguido pelo cozimento de arroz normal, com uma redução de 82,3% de aflatoxina B₁ e 83,7% de ocratoxina A, e finalmente o arroz preparado no microondas com uma redução de 72,5% de aflatoxina B₁ e 82,4% de ocratoxina A. A água em excesso usada na preparação do arroz também foi analisada e encontraram

aproximadamente 8,5% e 11,0% da concentração inicialmente contaminada, com aflatoxina B₁ e ocratoxina A respectivamente, indicando uma possível migração da toxina para a água durante o cozimento.

No período de julho de 1998 a dezembro de 2001, 366 amostras de alimentos consumidos no Distrito Federal foram analisadas para detectar presença de aflatoxina de ocratoxina A. Os alimentos eram amendoim e derivados, milho (pipoca e grão), castanhas, produtos de trigo e/ou aveia, arroz e feijão. Através de Cromatografia em Camada Delgada, detectou-se as contaminações por micotoxinas. Foram detectadas aflatoxina em 19,6% das amostras de milho e castanhas (< 2 ppb). Nas amostras de amendoim e derivados a incidência de contaminação por aflatoxina foi maior, 34,7% das amostras com até 1706 ppb, ultrapassando os níveis permitidos pela legislação brasileira. A ocratoxina A não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas (CALDAS; OLIVEIRA; SIVA, 2002).

Farias et al., (2000) encontraram 56% de 600 amostras de milho provenientes do Paraná, Goiás, Mato Grosso do Sul, Argentina e Paraguai contaminadas com aflatoxina.

Hennigen e Dick (1995) não encontraram zearalenona em 36 amostras de milho produzidas no Rio Grande do Sul.

Hashimoto et al., (2003) analisaram 42 amostras de cinco marcas comerciais de rações para peixes entre março a junho de 2001 adquiridas no Município de Londrina. O estudo foi feito visando a qualidade das rações que depende de um controle sanitário da matéria prima básica de origem vegetal utilizada na formulação, devido a susceptibilidade aos fungos micotoxigênicos. As matérias-primas básicas utilizadas na formulação de rações para peixes são o milho, a soja, o arroz e o trigo, que são facilmente contaminados por *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. produtores de aflatoxinas e fumonisinas respectivamente. Os níveis de aflatoxina nas rações foram inferiores ao limite permitido pela legislação brasileira. A detecção de fumonisina teve valor máximo de 11,22 ppm, sendo que ainda não existe limites

legais estabelecidos. Apesar de baixo os níveis de aflatoxina e fumonisina, a co-ocorrência poderia resultar no risco de sinergismo tóxico.

Entre julho de 2001 a novembro de 2002 em 12 municípios da região Norte do Paraná foram coletadas 272 amostras para análise de aflatoxina e 189 amostras para análise de zearalenona. As amostras eram formadas por alimentos volumosos (silagens) e concentrados (grãos e rações comerciais ou preparadas nas propriedades). Estas rações eram fornecidas ao gado leiteiro. Os principais ingredientes utilizados nas rações foram o milho e a soja. Das amostras comerciais 17 foram detectadas aflatoxina, sendo oito acima dos níveis permitido pela legislação. As amostras preparadas na propriedade oito estavam acima do permitido, esta contaminação pode estar relacionada ao preparo com grãos de milho de diferentes procedências sem garantia do controle de micotoxinas e presença de roedores no local de armazenagem que também pode contribuir para a contaminação (SASSAHARA; YANAKA; PONTES NETTO, 2003).

Farias et al., (2000) avaliaram 60 amostras de milho coletadas em três localidades do Paraná: Andirá, Apucarana e Sarandi. Gêneros mais importantes envolvidos na produção de micotoxinas foram isolados das amostras, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. A avaliação do potencial toxigênico das espécie *A.flavus* isolados, demonstrou que 67% possuíam potencial para síntese de aflatoxinas B₁ e B₂. Todos os isolados da espécie *A.parasiticus* demonstraram potencial para síntese de aflatoxina B₁, B₂, G₁ e G₂.

3.11 MÉTODOS CORRETIVOS E PREVENTIVOS

As micotoxinas são contaminantes naturais, sendo impossível assegurar a sua completa eliminação dos produtos alimentares. Mas a sua presença pode e deve ser minimizada a níveis que não apresentem risco para a saúde. Em algumas situações

recomenda-se a aplicação do princípio *ALAR*, que significa “*tão baixo quanto seja razoável*” (SERRA, 2005).

É possível reduzir os níveis de micotoxinas nos alimentos através da implementação de medidas de controle, como o HACCP (ou APPCC): Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle. O HACCP baseia-se na identificação e estabelecimento de perigos em alimentos, e na implementação de formas de controlá-los, baseadas nos processos de fabricação. Constata-se então que não é possível garantir alimentos seguros apenas com base em análises do produto final, visto que é impossível testar 100% deles. O HACCP baseia-se na suposição de que boas práticas de fabricação, higiene e armazenamento correto resultam na obtenção de produtos finais com perigos controlados (SERRA, 2005).

A importância do sistema HACCP abrange também o comércio internacional de alimentos, na prevenção de doenças por alimentos, aspecto de particular importância para os países em desenvolvimento que carregam o peso destas e com a limitação cada vez maior de seus recursos para o controle da inocuidade de alimentos (GMP/HACCP... 2007).

A contaminação em rações pode ser reduzida com o uso de adsorventes comerciais compostos, por exemplo, de aluminossilicato de cálcio e sódio hidratados; incluindo ainda minerais como ferro, potássio e magnésio (SCAMIX®; MICOSORB®).

Estudos feitos por Pires et al., (1998) mostram que amônia anidra (2- 3%) pode ser utilizada no controle de fungos, e na conservação da quirera de milho, por possuir propriedade anti - fúngica. A aplicação em forragens com alto teor de umidade, evitou o desenvolvimento de fungos e bactérias.

Somente com trabalhos de orientação aos produtores e com ações eficientes da Vigilância Sanitária, será possível a diminuição da exposição da população a aflatoxinas e conseqüente diminuição de riscos à saúde (CALDAS; OLIVEIRA; SILVA, 2002).

3.12 MÉTODOS IMUNOLÓGICOS NA DETECÇÃO E DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS EM ALIMENTOS

As micotoxinas têm sido detectadas por técnicas físico-químicas e biológicas. Dentre as técnicas físico-químicas, estão as cromatográficas (camada delgada e líquida de alta eficiência) e as instrumentais (fluorodensitometria e espectrofotometria). As técnicas biológicas incluem os bioensaios (cultura de tecidos, animais e microrganismos) e imunoenaios (radioimunoensaio, cromatografia de afinidade e *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* – ELISA). Muitas destas técnicas são dispendiosas, demoradas, de execução complexa e requerem instrumentação sofisticada (BITTENCOURT; FREITAS, 2005).

Um método ideal, eficiente e adequado para análise de micotoxinas deve ser simples, rápido, preciso, barato, automatizado, sensível e seletivo. Contudo, nenhum método satisfaz a todos esses requisitos. Conseqüentemente, o método adequado deve ser escolhido pelo objetivo da análise que se quer realizar o trabalho, de rotina ou em pesquisa (BARNI, 2001).

Métodos imunológicos têm sido largamente utilizados na pesquisa de micotoxinas, devido a sua sensibilidade, especificidade, rapidez e simplicidade. Utilizam anticorpos específicos para isolar e/ou detectar micotoxinas nos alimentos. Estes métodos têm como base a interação entre antígeno (micotoxinas) e anticorpos específicos, (Figura 10) produzidos em um organismo animal, geralmente o coelho, pelos linfócitos B (AMADO, 2006).

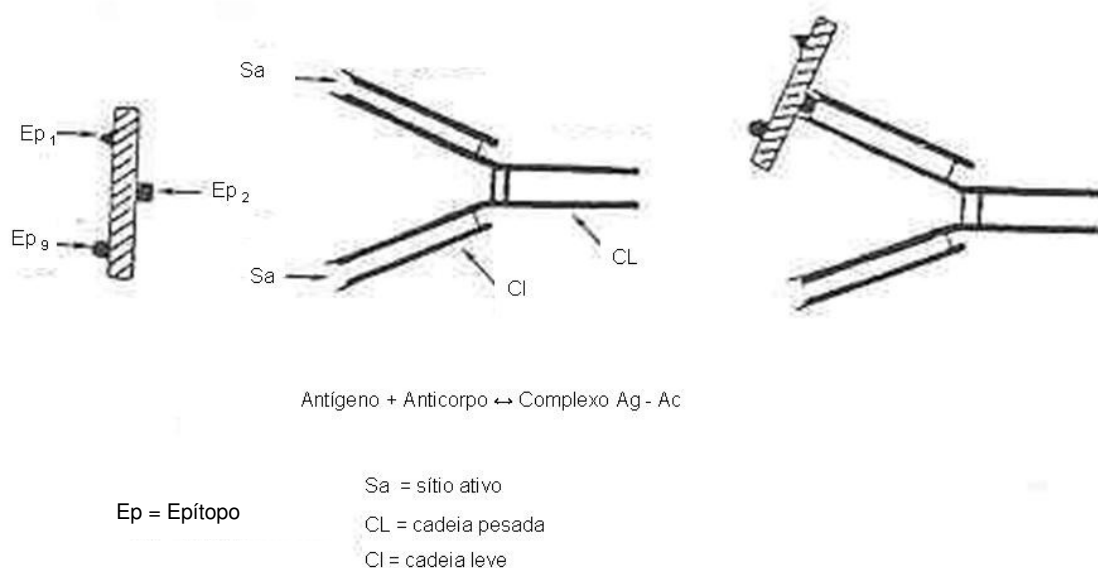


FIGURA 10 – Reação antígeno – anticorpo

FONTE: AMADO, 2006

Entre os métodos imunológicos utilizados na dosagem de micotoxinas os mais comuns são o ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) aprovado como método oficial da AOAC para triagem de aflatoxinas e outras micotoxinas, RIA (*radio-imuno-assay*) e IAC (*immunoaffinity chromatography*). As duas técnicas, RIA e ELISA, são baseadas na competição de ligação entre a toxina não marcada proveniente da amostra e a toxina marcada sobre os locais específicos do anticorpo; a imunoafinidade (IAC) é uma técnica cromatográfica baseada diretamente na ligação antígeno (toxina) com o anticorpo fixado numa coluna (AMADO, 2006).

A primeira técnica imunológica a ser introduzida foi o radioimunoensaio em finais dos anos 50. A partir daí, os imunoensaios tornaram-se importantes instrumentos de análise na química clínica, sendo utilizados na análise de alimentos, mais concretamente na pesquisa de micotoxinas, a partir dos anos 80. Este atraso deveu-se ao fato das micotoxinas serem haptenos, o que significa que não são imunogênicas, tendo que conjugar-se com uma proteína antes de ocorrer a imunização, para se obter o anti-soro. Estas conjugações podem complicar-

se, porque a maioria das micotoxinas não tem um grupo reativo adequado na molécula para unir à proteína suporte. Este fato levou ao desenvolvimento rápido de métodos para preparação de conjugados de micotoxinas e em particular de conjugados de aflatoxinas. Atualmente pode dispor-se de anti-soros contra algumas micotoxinas e micotoxinas marcadas com indicador, tendo sido a maioria já utilizada na determinação de aflatoxinas (AMADO, 2006).

O teste de ELISA quantitativo tem padrões, com valores de concentração conhecidos. A partir destes padrões, pode-se traçar uma curva de calibração. As leitoras de microplacas têm graus elevados de automação. Com a utilização de uma leitora automática de microplacas, os valores de absorbância, além de serem obtidos com alta precisão, poderão ser submetidos aos cálculos necessários para a correta obtenção dos resultados (BITTENCOURT; FREITAS, 2005).

O método de ELISA pode ser competitivo ou não. No ELISA competitivo, o analito aparece em concentrações variáveis na mistura da reação em contato com o anticorpo específico, e compete com uma quantidade constante de analito previamente imobilizado na fase sólida. A concentração do anticorpo deve ser limitada a fim de assegurar a eficácia da competição. No ensaio não competitivo, o anticorpo reage proporcionalmente com a quantidade de analito da amostra. Em ambos os métodos, a quantidade de anticorpo que no final se mostra ligado à fase sólida, é direta ou inversamente proporcional à quantidade de analito na amostra original. Para detectarmos este anticorpo ligado pode utilizar-se uma técnica direta ou uma técnica indireta (AMADO, 2006).

Na técnica direta, o anticorpo específico, é fixado sobre a placa ou tubo de microtitulação. Em seguida, a solução de amostra e uma quantidade conhecida como conjugado "toxina-enzima" são incubados simultaneamente. Depois de lavagem, a toxina - enzima ligada à placa por intermédio do anticorpo, é "revelada" por junção de um substrato

cromogêneo específico de enzima. A cor obtida é medida por fotometria ou apreciada visualmente (AMADO, 2006).

No método competitivo direto para análise quantitativa de aflatoxina e de zearalenona, a toxina é extraída de uma amostra agitando-a com metanol e água. O extrato obtido é filtrado, diluído (apenas para aflatoxina) e depois testado através do imunoensaio. O conjugado toxina-enzima é pipetado nos poços (placa), seguido dos calibradores ou os extratos das amostras. Depois é adicionado o anticorpo para início da reação. Durante o período de incubação (10 minutos), a aflatoxina da amostra compete com o conjugado toxina-enzima, por um número limitado de anticorpos anti-toxina, que por sua vez se ligam aos anticorpos secundários imobilizados no interior dos poços. Após período de incubação, o conteúdo dos poços é descartado e os mesmos lavados com água deionizada para remoção de qualquer conjugado ou toxina que não tenha sido ligada ao anticorpo. Um substrato é então adicionado nos poços e o conjugado toxina-enzima ligado aos anticorpos, converte a solução à cor azul. Mais uma incubação de 10 minutos é feita e em seguida a reação é interrompida e a intensidade da cor de cada poço é lida em leitor ELISA. As cores das amostras desconhecidas são comparadas com as cores dos calibradores para obter a concentração de micotoxina. A Figura 11 mostra uma representação esquemática de um método imunoenzimático (ELISA) (ALL QUALITY, 2006).

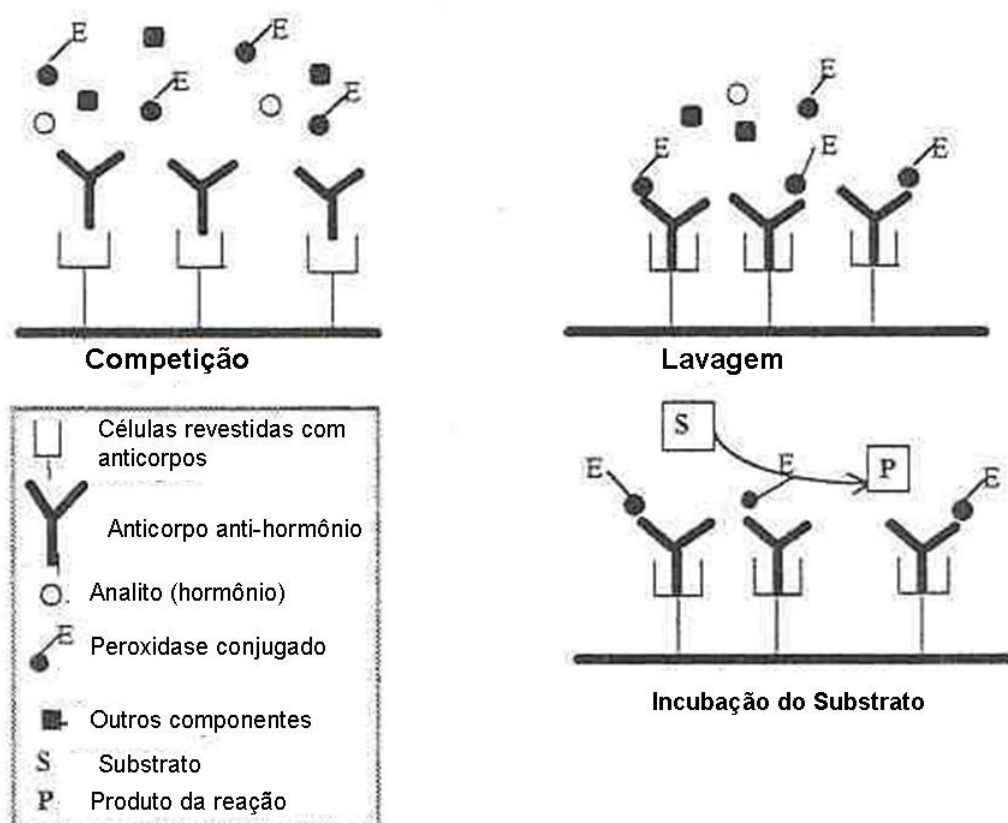


FIGURA 11 – Representação esquemática de um método imunoenzimático (ELISA)

FONTE: AMADO, 2006.

Na técnica indireta, a toxina é fixada sobre a placa por intermédio de um conjugado toxina-polipeptídeo. Em seguida, a solução de amostra e uma quantidade constante de anticorpo são incubados simultaneamente. Depois da lavagem, a quantidade de anticorpo ligado à placa é determinada por junção de um conjugado enzimático. A cor obtida depois da junção do substrato cromogêneo específico da enzima é medida da mesma maneira que na técnica direta. As enzimas marcadoras mais utilizadas são: catalase, glucose-oxidase, galactosidase, fosfatase alcalina e peroxidase (AMADO, 2006).

De acordo com Amado (2006), o método de ELISA tem algumas desvantagens e tem sido posto em dúvida devido a possíveis interferências de outros componentes da amostra e variabilidade devido às condições do teste. Outro problema possível é a especificidade e seletividade do ELISA. De fato, muitas micotoxinas têm estruturas químicas estreitamente

afins e por isso, existe a possibilidade de poderem ocorrer reações cruzadas entre os anticorpos produzidos para uma determinada aflatoxina, contra outras toxinas que podem aparecer ao mesmo tempo, dentro do mesmo grupo. Em alguns dos equipamentos comerciais para aflatoxinas, pode acontecer que o anticorpo mostre uma certa reatividade cruzada com outras aflatoxinas. O resultado considerado positivo pode não dar informação seletiva no que se refere à concentração das aflatoxinas separadas. O teste ELISA pode, desta forma, conduzir a resultados falso-positivos.

Apesar dos inconvenientes citados acima, os métodos de ELISA são largamente utilizados em pesquisas de micotoxinas em alimentos, por apresentar vantagens como: sensibilidade; enorme quantidade de amostras que podem manipular em um único dia, o que se traduz em baixo custo por análise; a necessidade de pequenas quantidades de anticorpo diluído, podendo usar-se a mesma quantidade para um grande número de amostras (AMADO, 2006).

3.13 LEGISLAÇÃO

Cerca de 100 países possuem legislação sobre uma ou mais micotoxinas em diversos alimentos (FAO, 2003). A decisão sobre que micotoxina regulamentar, em que produtos e em que níveis é muito complexa. Na maior parte dos países, as regulamentações sobre micotoxinas não foram baseadas em estabelecimentos de riscos sólidos. O estabelecimento de limites por parte de um país é influenciado por diversos fatores, como os métodos analíticos disponíveis para o controle legal, os dados sobre toxicologia e a existência de legislação em outros países com os quais existam trocas comerciais. A falta de uma abordagem unificada entre países resultou em uma grande variedade de recomendações e regulamentações no que diz respeito às micotoxinas. Vários fatores dificultam uma abordagem comum, alguns destes fatores relacionados a conflitos de interesses nacionais e comerciais. Os interesses dos países

produtores não coincidem necessariamente com os dos países importadores e a presença de micotoxinas em alimentos pode levar a barreiras comerciais a menos que todas as partes concordem em definir níveis seguros de micotoxinas e respeitar os seus próprios interesses. Em geral, os países produtores têm limites mais elevados para as micotoxinas nos produtos que os países importadores. Outros fatores impeditivos dizem respeito à diferente interpretação e análise, bem como diferenças nos padrões alimentares (SERRA, 2005).

3.13.1 Legislação no Brasil

O Ministério da Saúde, Resolução RDC n° 274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002, publicada no Diário Oficial da União, de 16/10/2002 estabelece que para alimentos utilizados para consumo humano como amendoim (com casca, descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim (pasta de amendoim ou manteiga de amendoim) e milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído, farinhas e sêmolos) a concentração máxima permitida em relação a Aflatoxinas (B1+B2+G1+G2) é de 20 µg/kg (ppb).

Para alimentos utilizados na alimentação animal como matérias primas e rações o Ministério da Agricultura, baixou a Portaria MA/SNAD/SFA N°. 07, de 09/11/88 - publicada no Diário Oficial da União de 09 de novembro de 1988 - Seção I, página 21.968, a concentração máxima permitida de Aflatoxinas é de 50 µg/kg (ppb).

De acordo com o Regulamento Técnico do Milho, aprovado pela Portaria n° 85 do Ministério da Agricultura, Anexo XV:

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento poderá, sempre que julgar necessário, em ação de caráter temporário ou por tempo indeterminado, exigir a análise de micotoxinas, especialmente para Aflatoxina, Ocratoxina A, Zearalenona, Fumonisina e Vomitoxina, de resíduos e outros contaminantes do milho posto à comercialização, independentemente do resultado de sua classificação.

3.13.2 Legislação no Mercosul

De acordo com a Resolução n° 25, de 20 de junho de 2002 da Anvisa estabelece que para o milho em grão, inteiro, partido, amassado ou moído, farelo de milho, a concentração máxima permitida de Aflatoxina (B1+B2+G1+G2) é de 20 µg/kg (ppb).

3.13.3 Posições Adotadas pela União Européia (UE)

Segundo Serra (2005), na UE, a responsabilidade do estabelecimento toxicológico de contaminantes para a saúde humana e ambiental cabe ao Comitê Científico dos Alimentos (SCF). Em seguida, vários grupos de trabalhos e comitês de peritos com delegados de todos os estados membros preparam propostas. Após consultas detalhadas, é entregue uma proposta ao SCF para uma avaliação final, em seguida a Comissão Européia estabelece uma Comissão Executiva com representantes de todos os estados membros, o que conduz à regulamentação resultante. Visto que a UE é um parceiro importante no comércio internacional, no estabelecimento de níveis máximos de micotoxinas são levadas em conta normas internacionais (*Codex Alimentarius*) de forma a assegurar que o comércio internacional não é impedido sem justificativa. Correntemente estão regulamentados os níveis de aflatoxinas em diversos produtos alimentares. As regulamentações podem ser encontradas nas páginas da UE na internet: <http://europa.eu.int/eur-lex/en/index.html>. Os níveis máximos admissíveis de micotoxinas em alimentos estabelecidos na união européia podem ser observados na Tabela 4.

TABELA 4 – Níveis máximos admissíveis de micotoxinas em alimentos estabelecidos na União Europeia

<i>Tipo de Alimento</i>	<i>Níveis máximos admissíveis (ppb)</i>				
	<i>Patulina</i>	<i>Aflatoxinas</i>			<i>OTA</i>
		<i>B1</i>	<i>B1+B2+G1+G2</i>	<i>M1</i>	
Nozes e frutos secos	-	2 - 8	4 - 15	-	-
Cereais	-	2	4	-	3 - 5
Leite	-	-	-	0,05	-
Especiarias	-	5	10	-	-
Uvas passas	-	-	-	-	10
Sumos de frutas (exceto uvas), maçãs e seus derivados	10 - 50	-	-	-	-
Sumo de uva	50	-	-	-	2*
Vinho	-	-	-	-	2*
Café e seus derivados	-	-	-	-	5 - 10*

* aguardando adoção formal pela Comissão

FONTE: SERRA, 2005

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

a) Amostras

Foram adquiridas 70 amostras de quirera de milho da região dos Campos Gerais para consumo humano e animal, mantidas a temperatura de -18°C até o momento do uso.

- Consumo Humano: 19 marcas diferentes de quirera adquiridas no comércio dos Campos Gerais sendo quatro delas de dois lotes diferentes, totalizando 23 amostras.
- Consumo Animal: 47 amostras adquiridas na região dos Campos Gerais, em casas agropecuárias, supermercados ou em moinhos da região.

b) Equipamentos e reagentes pró-análises.

c) *Kit para análise de aflatoxina ELISA Beacon Analytical Systems Inc.* distribuído por *All Quality* distribuidor exclusivo no Brasil (Itapetininga/SP) contendo:

- 01 placa contendo 12 tiras de 08 poços cada, revestidas com anticorpos, embalados à vácuo em embalagem de alumínio com dessecante;
- 05 frascos de calibradores de aflatoxina correspondentes a 0,0; 2,0; 7,5; 25,0 e 100 µg/L (ppb) de aflatoxina;
- 01 frasco contendo 08 mL de conjugado aflatoxina – enzima (HRP – Horse Radish Peroxidase – Peroxidase de Rábano);
- 01 frasco contendo 08 mL de solução de anticorpo anti-aflatoxina;
- 01 frasco contendo 14 mL de substrato;
- 01 frasco de solução “STOP” (ácido clorídrico 1N);
- 01 planilha no Excel, para obtenção dos resultados em ppb.

d) *Kit* para análise de zearalenona ELISA *Beacon Analytical Systems Inc.* distribuído por *All Quality* distribuidor exclusivo no Brasil (Itapetininga/SP) contendo:

- 01 placa contendo 12 tiras de 08 poços cada revestidas com anticorpos, embalados à vácuo em embalagem de alumínio com dessecante;
- 05 frascos de calibradores de aflatoxina correspondentes a 0,0; 0,02; 0,05; 0,25 e 1,0 µg/mL (ppm) de zearalenona (OBS: os calibradores, na verdade, contém 1/5 do valor estimado devido a diluição de 1:5 das amostras de grãos no passo de extração. Portanto, não é necessária a correção do fator de diluição no cálculo concentração de zearalenona na amostra original;
- 01 frasco contendo 08 mL de conjugado zearalenona – enzima (HRP – Horse Radish Peroxidase – Peroxidase de Rábano);
- 01 frasco contendo 08 mL de solução de anticorpo anti-zearalenona;
- 01 frasco contendo 14 mL de substrato;
- 01 frasco de solução “STOP” (ácido clorídrico 1N);
- 01 planilha no Excel, para obtenção dos resultados em ppm.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Amostragem

a) Quirera destinada para consumo humano

As amostras destinadas ao consumo humano foram adquiridas em supermercados da região dos Campos Gerais, não sendo necessariamente produzidas nesta região. Este material é vendido em embalagens plásticas de 500g ou 1kg.

Para que as marcas utilizadas não fossem citadas, as amostras foram codificadas da seguinte maneira: o número indica o lote e a letra a marca. Exemplo: 01P e 02P, indica que dois lotes da marca P, foram analisados.

b) Quirera destinada para consumo animal

As amostras foram coletadas em agropecuárias, moinhos e supermercados. Nas agropecuárias, a quirera é armazenada em sacos de polipropileno com capacidade de 50Kg ou em caixas de madeira de 60kg e comercializada em porções, conforme solicitação do cliente. Foram adquiridas amostras de 5kg. As amostras adquiridas em supermercados, eram vendidas em sacos plásticos de 5kg e nos moinhos, foram retiradas pequenas quantidades de vários sacos de polipropileno de 50kg, de diferentes pontos, conforme a disposição no armazém.

4.2.2 Preparo da Amostra

a) Quirera destinada para consumo humano

As amostras foram homogeneizadas e moídas em moinho de rotor da marca Tecnal, modelo Tecmil TE – 633. Foram então codificadas e armazenadas em sacos plásticos e mantidas a temperatura de -18°C, até o momento das análises.

b) Quirera destinada para consumo animal

O mesmo procedimento foi adotado para amostras de consumo humano. Todas as amostras foram catalogadas com dados de marcas, produtor e região, sendo codificadas segundo o município de procedência, o local de coleta e a forma de embalagem ou de armazenamento (Tabela 5). A Figura 12 mostra algumas formas de embalagem e armazenagem das amostras coletadas.

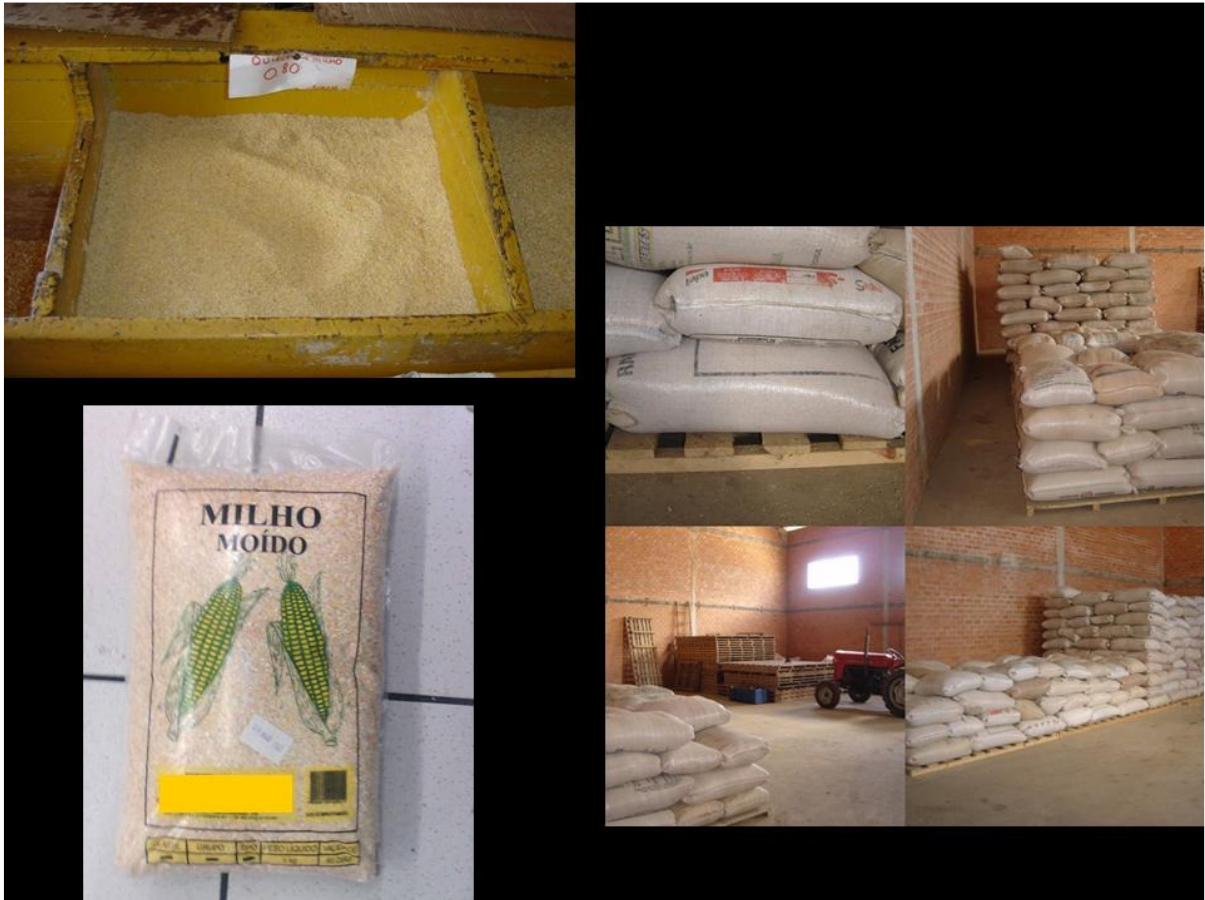


FIGURA 12 – Formas de embalagem e armazenagem das amostras coletadas

TABELA 5 – Codificação das amostras segundo município de procedência e forma de armazenamento

CÓDIGO AMOSTRA	PROCEDÊNCIA	FORMA DE ARMAZENAMENTO
01	Reserva	Sacos de polipropileno de 50 Kg
02	Cândido de Abreu	Sacos de polipropileno de 50 Kg
03	Imbau	Sacos de polipropileno de 50 Kg
04	Imbituva	Caixas de Madeira de 60 Kg
05	Imbituva	Caixas de Madeira de 60 Kg
06	Ortigueira	Sacos de polipropileno de 50 Kg
07	Reserva	espalhado pelo chão*
08	Ponta Grossa	Sacos Plástico 5Kg
09	Ponta Grossa	Sacos Plástico 5Kg
10	Ponta Grossa	Sacos de polipropileno de 50 Kg
11	Carambeí	Sacos de polipropileno de 50 Kg
12	Palmeira	Sacos de polipropileno de 50 Kg
13	Palmeira	Sacos de polipropileno de 50 Kg
14	Palmeira	Sacos de polipropileno de 50 Kg
15	Palmeira	Sacos de polipropileno de 50 Kg
16	Palmeira	Sacos de polipropileno de 50 Kg
17	Palmeira	Sacos de polipropileno de 50 Kg
18	Palmeira	Sacos de polipropileno de 50 Kg
19	Campo Largo	Sacos Plásticos 5 Kg
20	Campo Largo	Sacos Plásticos 5 Kg
21	Palmeira	Sacos Plásticos 5 Kg
22	Castro	Sacos de polipropileno de 50 Kg
23	Castro	Sacos de polipropileno de 50 Kg
24	Ponta Grossa	Sacos de polipropileno de 50 Kg
25	Ponta Grossa	Sacos de polipropileno de 50 Kg
26	Ponta Grossa	Sacos de polipropileno de 50 Kg
27	Ivaí	Sacos Plásticos 5 Kg
28	Ivaí	Sacos Plásticos 5 Kg
29	Jaguariaíva	Sacos Plásticos 5 Kg
30	Jaguariaíva	Sacos Plásticos 5 Kg
31	Guaragi**	Sacos Plástico 5 Kg
32	Teixeira Soares	Sacos Plástico 5 Kg
33	Ipiranga	Sacos Plástico 5 Kg
34	Ipiranga	Caixas de Madeira de 60 Kg
35	Ipiranga	Sacos de polipropileno de 50 Kg
36	Ipiranga	Sacos de polipropileno de 50 Kg
37	Ivaí	Sacos Plástico 5 Kg
38	Teixeira Soares	Caixas de Madeira de 60 Kg
39	Tibagi	Sacos de polipropileno de 50 Kg
40	Castro (Tronco)	Sacos de polipropileno de 50 Kg
41	Palmeira	Sacos de polipropileno de 50 Kg
42	Telêmaco Borba	Caixas de Madeira de 60 Kg
43	Arapoti	Caixas de Madeira de 60 Kg
44	Piraí do Sul	Sacos Plásticos 1Kg
45	Ponta Grossa	Sacos de polipropileno de 50 Kg
46	Ponta Grossa	Sacos de polipropileno de 50 Kg
47	Ponta Grossa	Sacos de polipropileno de 50 Kg

* chamado resíduo de varredura: ao final do dia, o chão do moinho é varrido, e esse resíduo é moído

** distrito do município de Ponta Grossa

Os municípios dos Campos Gerais, locais de coleta, podem ser melhor observados no mapa da região (Figura 13).



FIGURA 13 – Mapa dos Campos Gerais: Municípios de procedência

4.2.3 Composição química

As análises físico-químicas, realizadas segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005), foram:

- Teor de Umidade (UM)
- Teor de Cinzas (CIN)
- Teor de Lipídeos (Extrato Etéreo - EE)
- Teor de Proteína Bruta (PB)
- Teor de Fibra Bruta (FB)
- Teor de Carboidratos: foi determinado por cálculo $CH = 100 - (UM + CIN + EE + PB + FB)$.

4.2.4 Determinação Micotoxinas

As análises de micotoxinas foram realizadas através do *Kit* de Elisa Beacon adquiridos na empresa All Quality.

4.2.4.1 Aflatoxina

O *Kit* Beacon Aflatoxina – Alta Sensibilidade – Placa é um teste imunológico que utiliza o método de ELISA competitivo para análise quantitativa de aflatoxina.

a) Preparação do Extrato

O extrato para a determinação de aflatoxina foi obtido de 50 gramas de uma amostra triturada e homogeneizada do material, em uma mistura de metanol e água (80:20v/v). O material foi homogeneizado em liquidificador doméstico (na máxima rotação, por aproximadamente um minuto), mantido em repouso por aproximadamente dois minutos para a separação do material sólido, sendo o sobrenadante filtrado (mínimo 10mL) primeiramente em papel filtro qualitativo e após em papel filtro quantitativo. 5mL do extrato foram diluídos em 20mL de água destilada e homogeneizados. O material foi filtrado novamente em papel de filtro quantitativo, se constituindo no extrato para o imunoensaio.

b) Análise Imunoensaio

Os extratos foram armazenados sob refrigeração, por no máximo 12 horas. Foram transferidos 50µL do conjugado de aflatoxina-enzima (HRP) em temperatura ambiente, para cada um dos poços da placa, seguidos pela adição de 50µL dos calibradores ou dos extratos das amostras. A solução de anticorpo anti-aflatoxina (50µL) foi adicionada em cada um dos poços para o início da reação. A placa foi agitada vigorosa e cuidadosamente para que houvesse a homogeneização do conteúdo dos poços. O tempo de reação foi de 10 minutos

(em temperatura ambiente). Durante esse período, a aflatoxina presente nos calibradores e que pode estar presente nas amostras, compete com o conjugado aflatoxina-enzima (HRP) por um número limitado de anticorpos anti-aflatoxina, que por sua vez se ligarão aos anticorpos secundários que estão imobilizados no interior dos poços. Passado o período de reação, o conteúdo dos poços foi descartado e os mesmos foram lavados com água destilada por 5 vezes em uma lavadora de microplacas Stat, modelo FAX 2600, para remoção de qualquer conjugado ou toxina que não tenha sido ligada ao anticorpo. Após a última lavagem, 100µL do substrato foram adicionados nos poços e o conjugado aflatoxina-enzima ligado aos anticorpos converte a solução incolor à cor azul. Após 10 minutos a reação foi interrompida com 100µL de solução de HCl 1N e a intensidade da cor (agora amarela) de cada poço lida em leitor ELISA da Bio Tec, modelo ELX 800. Os valores de absorbância (comprimentos de onda 450 nm) das amostras desconhecidas são comparados com os valores dos calibradores, para obter-se a concentração de aflatoxina. Os valores de absorbância são lançados em uma planilha e os resultados expressos em ppb.

4.2.4.2 Zearalenona

O *Kit* Beacon Zearalenona – Placa é um teste imunológico que utiliza o método de ELISA para análise quantitativa de zearalenona.

a) Preparação do Extrato

O extrato para a determinação de zearalenona foi obtido de 20 gramas de uma amostra triturada e homogeneizada do material em uma mistura de metanol e água (70:30v/v). O material foi homogeneizado em liquidificador doméstico (na máxima rotação por aproximadamente um minuto), mantido em repouso por aproximadamente dois minutos para a separação do material sólido, sendo o sobrenadante filtrado (mínimo 15mL) primeiramente

em papel filtro qualitativo e após em papel filtro quantitativo se constituindo no extrato para o imunoensaio.

b) Análise Imunoensaio

Os extratos foram armazenados sob refrigeração, por no máximo 12 horas. Foram transferidos 50µL do conjugado de zearalenona-enzima (HRP) em temperatura ambiente, para cada um dos poços da placa, seguidos pela adição de 50µL dos calibradores ou dos extratos das amostras. A solução de anticorpo anti-zearalenona (50µL) foi adicionada em cada um dos poços para o início da reação. A placa foi agitada vigorosa e cuidadosamente para que houvesse a homogeneização do conteúdo dos poços. O tempo de reação foi de 10 minutos (em temperatura ambiente). Durante esse período, a aflatoxina presente nos calibradores e que pode estar presente nas amostras, compete com o conjugado zearalenona-enzima (HRP) por um número limitado de anticorpos anti-zearalenona, que por sua vez se ligarão aos anticorpos secundários que estão imobilizados no interior dos poços. Passado o período de reação, o conteúdo dos poços foi descartado e os mesmos foram lavados com água destilada por 5 vezes em uma lavadora de microplacas Stat, modelo FAX 2600, para remoção de qualquer conjugado ou toxina que não tenha sido ligada ao anticorpo. Após a última lavagem, 100µL do substrato foram adicionados nos poços e o conjugado zearalenona-enzima ligado aos anticorpos converte a solução incolor à cor azul. Após 10 minutos a reação foi interrompida com 100µL de solução de HCl 1N e a intensidade da cor (agora amarela) de cada poço lida em leitor ELISA da Bio Tec, modelo ELX 800. Os valores de absorbância (comprimentos de onda 450 nm) das amostras desconhecidas são comparados com os valores dos calibradores, para obter-se a concentração de zearalenona. Os valores de absorbância são lançados em uma planilha os resultados expressos em ppb.

REFERÊNCIAS

AGOSTINI, P.D. et al. Valores de composição química e energética de alguns alimentos para aves. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 128-134, 2004.

ALESSI, M.O.; RAUPP, D.S. da; GARDINGO, J.R. Caracterização do processamento da farinha de milho biju para o aproveitamento dos subprodutos. *Publicatio UEPG Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias*, Ponta Grossa, v. 2, n. 9, p. 31-39, ago. 2003.

ALL QUALITY. *Protocolo de análise de kit ELISA Beacon*. Itapetininga. [2006 ?].

AMADO, M.A. *Métodos imunológicos na detecção e determinação de aflatoxinas em alimentos: Vantagens e inconvenientes*. Disponível em: <http://www.ipv.pt/millennium/Millennium26/26_21.htm> Acesso em: 18 mai. 2006.

AMARAL, K. A. S. do et al. Aflatoxins in corn-based food products traded in Brazil and risks to human health. *Ciência e Tecnologia Alimentos*. Campinas, v. 26, n. 2, p. 336-342, abr./jun. 2006.

ARROYO, T.R. *Hongos y Micotoxinas*. Montornés del Vallés (Barcelona): Lucta, 1986.

AVES – Micotoxicoses. Disponível em: <<http://www.fundacaoabc.org.br/Laboratorio/micotaves.htm>>. Acesso em: 21 jul. 2005.

BARNI, A. C. *Incidência de aflatoxinas em alimentos que compõem cesta básica comercializada na cidade de Curitiba/PR*. 2001, 78f. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

BETINA, V. Bioactive molecules. *Mycotoxins - chemical, biological and environmental aspects*. Amsterdam: Elsevier, 1989. v.9

BHATNAGAR, D.; LILLEHOJ; E. B.; ARORA, D. K. Handbook of applied mycology. *Mycotoxins in ecological systems*. New York: Marcel Dekker, 1992. v. 5.

BITENCOURT, L. E.; FREITAS, R. J. S. de. *Comparação de métodos cromatográficos por camada delgada e líquida com kits imunológicos para detecção de aflatoxinas em amendoim in natura e doce de amendoim*. 2005, 88f. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

BOVINOS – Micotoxicozes. Disponível em:
<<http://www.fundacaoabc.org.br/Laboratorio/micotbovinos.htm>>. Acesso em: 21 jul. 2005.

CALDAS, E. D.; OLIVEIRA, J.N.; SILVA, S.C. Aflatoxina e Ocratoxina A em Alimentos e Riscos para a Saúde Humana. *Revista Saúde Pública*. São Paulo, v. 36, n. 3, p. 319 – 323, jun. 2002.

CANÇADO, R. A.; FREITAS, R. J. S. de. CFLAE: Metodologia simplificada para detecção de aflatoxinas em milho. In: XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2002, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre, 2002. CD-ROM.

CARACTERÍSTICAS nutricionais do milho. Jun. 2005. Disponível em:
<<http://www.bungealimentos.com.br/nutricao/artigos.asp?id=3024>>. Acesso em: 01 mar. 2007.

CONCEITOS para formulação da ração. Jul. 2005. Disponível em:
<<http://www.bungealimentos.com.br/nutricao/artigos.asp?id=3029>>. Acesso em 01 mar. 2007.

CONFRONTO das Safras de 2005 e 2006 - Brasil – Janeiro 2006. Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa01200605.shtm>>. Acesso em: 09 mar. 2007.

CONFRONTO das Safras de 2005 e 2006 - Brasil – Fevereiro 2006. Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa02200606.shtm>>. Acesso em: 09 mar. 2007.

CONFRONTO das Safras de 2005 e 2006 - Brasil – Março 2006. Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa03200604.shtm>>. Acesso em: 09 mar. 2007.

CAST. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. *Council for Agricultural Science and Technology*. Ames, p.199, 2003 (Task Force Report, n. 139).

CASTRO, E. C.; AHUMADA, F. *Micotoxinas – Rol e Importância em Nutricion Acuicola*. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/field/003/AB482S/AB482S13.htm>>. Acesso em: 14 fev. 2007.

CAVALLI, S. B. Segurança alimentar: a abordagem dos alimentos transgênicos. *Revista de Nutrição*. Campinas, v.14, 2001.

DALPASQUALE, V. A. et al. Qual é o verdadeiro teor de umidade do milho? E da soja? In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, XVIII, 2002, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre, 2002. CD-ROM.

DHINGRA, O.D.; COELHO NETO, R.A. Micotoxinas em grãos. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. Passo Fundo, v.6, n.1, p.49-101, 1998.

DICIONÁRIO Histórico e Geográfico dos Campos Gerais. Disponível em: <http://www.uepg.br/dicion/campos_gerais.htm>. Acesso em: 02 out. 2005.

DIONELLO, R. G. et al. Secagem de milho na pequena propriedade e ocorrência de micotoxinas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, XVIII, 2002, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre, 2002. CD-ROM.

DUARTE, J. O. *Importância Econômico – Introdução e Importância Econômica do Milho*. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/importancia.htm>> Acesso em: 21 jul. 2005.

DUTRA, B. C. et al. Determinação de fibra alimentar insolúvel, solúvel e total em produtos derivados do milho. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, XVIII, 2002, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre, 2002. CD-ROM.

EQUINOS – Micotoxinoses. Disponível em: <<http://www.fundacaoabc.org.br/Laboratorio/micotequinos.htm>>. Acesso em: 21 jul. 2005.

ESTATÍSTICA DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA, 2007. In: Publicações Indicadores IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>>. Acesso em: 09 mar. 2007.

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

FAO. *Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003*. FAO Food and Nutrition paper 81. Disponível em: < <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5499e/y5499e00.pdf> >. Acesso em: 16 jan. 2007.

FISCHER JUNIOR, A. A. et al. Valores de energia metabolizável de alguns alimentos para aves. In: XXXIV Reunião da SBZ, 1997, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora, 1997. Disponível em: <<http://www.sbz.org.br/anais1997/Nnr/bnnr410.pdf>>. Acesso em 01 mar. 2007.

FONSECA, H. *Micotoxinas*. Disponível em <<http://www.micotoxinas.com.br/legisla.html>> Acesso em: 13 jul. 2005.

GLÓRIA, E. M. da. et al. Distribuição da contaminação com aflatoxinas em castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bompl.). In: XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2002, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre, 2002. CD-ROM.

GMP / HACCP: Boas Práticas de Manufatura (GMP) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP). Disponível em: <http://www.panalimentos.org/Panalimentos_por/haccp2/GUIA2.htm>. Acesso em: 12 fev. 2007.

GONÇALVES, R. A. et al. Rendimento e composição química de cultivares de milho em moagem a seco e produção de *grits*. *Revista Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 27, n. 3, p. 643-650, mai./jun. 2003.

GRÃOS 100% sadios. Disponível em: <http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?id=3645&tipo_tabela=negocios&categoria=insumos>. Acesso em: 06 fev. 2007.

HELFAND, S. M.; REZENDE G. C. *Mudanças na Distribuição Espacial da Produção de Grãos, Aves e Suínos no Brasil: o Papel do Centro-Oeste*. Disponível em: <http://www.ipea.gov.br/pub/ppp/ppp19/Parte_5.pdf#search='produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20milho%20no%20paran%C3%A1.pdf'>. Acesso em: 26 jun. 2005.

HAGLER, W. M.; MIROCHA, C. J. PATHRE, S. V. Identification of the naturally occurring isomer of zearalenol produced by *Fusarium roseum* 'Gibbosum' in rice culture. *Applied and Environmental Microbiology*. Washington, v.37, n.5, p.849-853, 1979.

HASHIMOTO, E. H. et al. Bromatologia e contaminação com fumonisina e aflatoxina em rações utilizadas na piscicultura da região de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 24, p.123-132, jan./jun. 2003.

HENNIGEN, M.R.; DICK, T. Incidence and abundance of mycotoxins in maize in Rio Grande do Sul, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, Londres, v. 12, p. 677-681, set./out.1995.

HERMANN, G. et al. Identificação de cepas de *Fusarium* spp potencialmente produtoras de fumonisinas durante o desenvolvimento do milho. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, XVIII, 2002, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre, 2002. CD-ROM.

INSTITUTO. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. 4 ed. Brasília: Anvisa, 2005.

JANK, M. S.; NASSAR, A.; TACHINARDI, M. H. *Brasil, Potência Agrícola Mundial*. Disponível em: <<http://www.granos.agr.br/arquivos/2124867993.pdf>>. Acesso em: 26 jun. 2005.

KITAZAWA, S. E. et al. Estudo Preliminar da contaminação por micotoxinas em arroz armazenado em silos submetidos a diferentes sistemas de secagem. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, XVIII, 2002, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre, 2002. CD-ROM.

LAZZARI, F. A. *Umidade, Fungos e Micotoxinas na Qualidade de Sementes, grãos e Rações*. 5. ed. Curitiba, set 1997. 134p.

LAZZARI, F.A.; MARCIA, B.A. Monitoramento de Fungos em Milho em Grão, Grits e Fubá. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.18, p.363-367, out./dez. 1998.

LLANILLO, R. F. Panorama da Produção Paranaense de Milho. In: *A cultura do Milho no Paraná*. Londrina: IAPAR, 1991. p.7-24.

LEGISLAÇÃO sobre micotoxinas. Disponível em: <<http://www.lamic.ufsm.br/legislacao.html>>. Acesso em: 28 nov. 2006.

LOPES, P. C. de A. *Milho*. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/sureg/pr/milho/milho_fevereiro_2006.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2006.

MALMANN, 2004. *Agrabond (afl) - Prueba de Adsorcion "in vivo"*. Disponível em: <http://www.agranco.com/s_agrabond_afl_prueba_invivo_espanol.htm> . Acesso em: 14 fev. 2007.

MARTINS, A. S. de et al. Degradabilidade *in situ* da matéria seca e proteína bruta de diferentes alimentos. In: XXXIV Reunião da SBZ, 1997, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora, 1997. Disponível em: <<http://www.sbz.org.br/anais1997/Nru/bnru551.pdf>>. Acesso em: 01 mar. 2007.

MARTINS, R. I. et al. Efeitos da relação de intermitência na secagem sobre a qualidade dos grãos de milho. In: XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2002, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre, 2002. CD-ROM.
MICOTOXINAS. *Especial Ave World*, Paulínia, Edição Especial, p. 1-12, abr./mai. 2004.

MELLON, J. E., COTTY, P. J. Effects of oilseed storage proteins on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. ***Journal of the American Oil Chemistry***, [S.l.], v. 75, n. 9, p. 1085-1089, 1998.

MELLON, J. E., DOWN, M. K., COTTY, P. J. Influence of lipids with and without other cottonseed reserve materials on aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, [S.l.], v. 48, n. 8, p. 3611-3615, 2000.

MELLON, J. E., DOWN, M. K., COTTY, P. J. Substrate utilization by *Aspergillus flavus* in inoculated whole corn kernels and isolated tissues. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, [S.l.], v. 53, n. 6, p. 2351-2357, 2005.

MELO, M. S. de ***Caracterização do patrimônio natural dos Campos Gerais do Paraná***. Relatório de Pesquisa. Ponta Grossa: UEPG, 2003.

MENEGAZZO, R. et al. Amostragem e monitoramento de micotoxinas em matérias primas para rações. In: SIMPÓSIO EM ARMAZENAGEM QUALITATIVA DE GRÃOS DO MERCOSUL, 2., 2001, Londrina. ***Anais...*** Londrina: SAG-Mercosul, 2001. p.42.

MILHO BR 3123 - Alta produtividade ao alcance do produtor. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/produtos/produtos/br3123.html>> Acesso em: 21 jul. 2005.

MILHO BRS 3151 Híbrido Triplo - Alta produtividade com estabilidade de produção. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/produtos/produtos/brs3151.html>> Acesso em: 21 jul. 2005.

MOLIN, R. ***Avaliação de Micotoxinas em Grãos de Milho nos Estágios Fenológicos Próximos à Colheita***. 1999, 68f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Fitotecnia) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1999.

MYCOSORB®. Disponível em: <<http://www.alltech.com/Brasil/about/mycosorb.htm>> . Acesso em: 12 fev. 2007.

NUNES, M. A. S. Pontos Críticos no Gerenciamento de Risco de Fungos e Micotoxinas. ***Revista Ave World***. Paulínia, n. 12, p. 30-33, out./nov. 2004.

O MILHO Geneticamente Modificado e seus Benefícios. ***Anuário Brasileiro do Milho***, Santo Cruz do Sul, p. 73-74, 2002.

ONO, E. Y. S. et al. Evaluation of fumonisin-aflatoxin co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA. *Food Additives and Contaminants*, [S.l.], v. 18, n. 8, p. 719-729, 2001.

ONO, E. Y. S. et al. Post-harvest storage of corn: effect of beginning moisture content on mycoflora and fumonisin contamination. *Food Additives and Contaminants*, [S.l.], v. 19, n. 11, p. 1081-1090, 2002.

PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. *Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento – Circular Técnica*, Sete Lagoas, n. 75, p. 1-6, 2006.

PEDROSO, A. *Dados Micotoxinas Fundação ABC*. Mensagem recebida por <paulalustoza@yahoo.com.br> em: 12 mar. 2007.

PEIXES – Micotoxinas. Disponível em: <<http://www.fundacaoabc.org.br/Laboratorio/micotpeixes.htm>>. Acesso em: 21 jul. 2005.

PENTEADO, R. Aspectos e implicações da participação do milho na alimentação humana. In: *Cultura do Milho*. Brasília: EMBRATER, 1983. cap. 17. p. 233-267.

PEREIRA, J. R. A. et al. Avaliação da produção de forragem e composição química de três cultivares de milho. In: Reunião da SBZ, XXXIV, 1997, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora, 1997. Disponível em: <<http://www.sbz.org.br/anais1997/Nru/bnru471.pdf>> . Acesso em: 01 mar. 2007.

PIRES, A. J. V. et al. *Amonização da quirera de milho com alta umidade. I. Conservação e Teor de Proteína Bruta*. Disponível em: <http://www.sbz.org.br/eventos/Fortaleza/Nut_rumi%5CSbz260.pdf> Acesso em: 05 jul. 2005.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Fungi and food spoilage*. 2. ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997.

PLANTA pode ter surgido no México. *Anuário Brasileiro do Milho*, Santo Cruz do Sul, p.14,2002.

PONCIANO, N. J.; SOUZA, P. M. de; REZENDE, A. M. Entraves da comercialização à competitividade do milho brasileiro. *Revista Paranaense de Desenvolvimento*. Curitiba, n. 104, p. 23-40, jan./jun. 2003.

PREVISÃO de safra de grãos aumenta 1,2%. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=832&id_pagina=1>. Acesso em: 09 mar. 2007.

PRODUÇÃO de cereais, leguminosas e oleaginosas - comparação entre as safras 2006 e 2007 - Brasil Janeiro de 2007. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa01200710.shtm>>. Acesso em 09 mar. 2007.

PROGNÓSTICO da produção de cereais, leguminosas e oleaginosas – comparação entre as safras 2005 e 2006 - Brasil - Dezembro de 2005. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa12200510.shtm>>. Acesso em: 09 mar. 2007.

QUALIDADE no Processamento de produção de rações para aves e suínos. Nov. 2005. Disponível em: <<http://www.bungealimentos.com.br/nutricao/artigos.asp?id=3039>>. Acesso em: 01 mar. 2007.

RADÜNZ, L. L. et al. Armazenamento de milho em pequenas propriedades e efeitos sobre a composição dos grãos. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, XVIII, 2002, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre, 2002. CD-ROM.

RIBEIRO, B. A.; MACHINSKI, P.A.; MACHINSKI JUNIOR, M. Ocorrência de aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona em produtos alimentícios à base de milho comercializados em Maringá (PR), Brasil. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, XVIII, 2002, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre, 2002. CD-ROM.

RODRIGUES, B. P. et al. Valores Energéticos do milheto, do milho e subprodutos do milho determinados com frangos de corte e galos adultos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 30, n. 6, nov./dez. 2001.

ROSSETTO, C. A. V.; SILVA, O. F.; ARAÚJO E. S. da. Storage peanut kernels fungal contamination and aflatoxin as affected by liming, harvest time and drying. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 309-315, mar./abr. 2005.

SANTURIO, J.M. Micotoxicoses em suínos: causas efeitos e controle. *Livro do simpósio de micotoxinas em grãos*, São Paulo: Fundação Cargil, 1999. p.125-150.

SANTURIO, J.M. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. Campinas, v.2, n.1, p.01-12, jan./abr. 2000.

SASSAHARA, M.; YANAKA, E.K.; PONTES NETTO, D. Ocorrência de aflatoxina e zearalenona em alimentos destinados ao gado leiteiro na Região Norte do Estado do Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*. Londrina, v.24, n.1, p.63-72, jan/jun. 2003.

SCAMIX®. Disponível em: <http://www.gruposcavet.com.br/noticia_restrito2.aspx?CodNoticia=1416>. Acesso em: 12 fev. 2007.

SCUSSEL, V.M. *Micotoxinas em alimentos*. Florianópolis: Insular, 1998. 144p.

SERRA, R. *Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A*. 2005, 330f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Universidade do Minho, Portugal, 2005.

SILVA, J. B. da, et al. Production of aflatoxins by *Aspergillus flavus* and of fumonisins by *Fusarium* species isolated from Brazilian sorghum. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.35, n. 3, p.182-186, set./nov. 2004.

SIMIONATO, E. M. R. S.; SYLOS C. M. Effect of Cooking on the Levels of Aflatoxin B₁ and Ochratoxin A in Rice. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v.7, n. 2, p.167-191, 24 nov. 2004.

SMART, M. G.; WICKLOW, D. T.; Caldwell, R. W. Pathogenesis in *Aspergillus* ear rot of maize: light microscopy of fungal spread from wounds. *Phytopathology*. 1990.

SOUZA, S. S. de. *Fundamentos da alimentação de peixes*. Disponível em <<http://www.bungealimentos.com.br/nutricao/artigos.asp?id=3018>>. mai. 2005. Acesso em: 01 mar. 2007.

SPERS, E. E.; KASSOUF, A. L. A abertura de mercado e a preocupação com a segurança dos alimentos. *Higiene Alimentar*. São Paulo, v.10, n.46, p.16-26, 1996.

STRINGARI, O. *Dados Climáticos (SIMEPAR)*. Mensagem recebida por: <paulalustoza@yahoo.com.br> em: 05 mar. 2007.

UM GRÃO que viajou com Colombo. *Anuário Brasileiro do Milho*, Santo Cruz do Sul, p. 6-9, 2002.

VALENTE, J. O. Milho na nutrição de bovinos. In: *Cultura do Milho*. Brasília: EMBRATER, 1983. cap. 16. p. 223-231.

VILAR, E.A. et al. Micotoxinas em aves e produtos avícolas. *Revista Higiene Alimentar*. Pernambuco, v. 17, p.17-29, jan./fev. 2003.

ZEARALENONA – FTRT. *Teste rápido para Zearalenona*. Disponível em: <http://www.gendiag.com.br/nossos_produtos/food-safety/5127ZON01>. Acesso em: 02 fev. 2007.