

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

TATIANA ROSELENA DE OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, FÚNGICA E MICOTOXICOLÓGICA DE
MILHO CRIOULO CULTIVADO NA REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS DO
PARANÁ

PONTA GROSSA
2009

TATIANA ROSELENA DE OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, FÚNGICA E MICOTOXICOLÓGICA DE
MILHO CRIÓULO CULTIVADO NA REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS DO
PARANÁ

Dissertação apresentada para obtenção do
título de mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos na Universidade Estadual de
Ponta Grossa.

Orientadora: Prof^a Dr. Ana Cláudia Barana.

Co-orientador: Prof^o Dr. David de Souza
Jaccoud Filho.

PONTA GROSSA
2009

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

O48c

Oliveira, Tatiana Roselena de

Caracterização físico-química, fúngica e micotoxicológica de milho crioulo cultivado na região dos Campos Gerais do Paraná. / Tatiana Roselena de Oliveira. Ponta Grossa, 2009.

126 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.) - Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora : Profa. Dra. Ana Cláudia Barana

Co-orientador : Prof. Dr. David de Souza Jaccoud Filho

1. Milho crioulo. 2. Micotoxinas. 3. Fungos. I. Barana, Ana Cláudia. II. Jaccoud Filho, David de Souza. III. T

CDD: 633.15

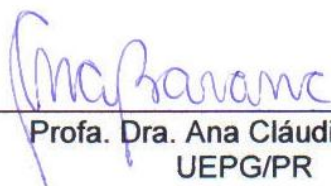
TERMO DE APROVAÇÃO

TATIANA ROSELENA DE OLIVEIRA

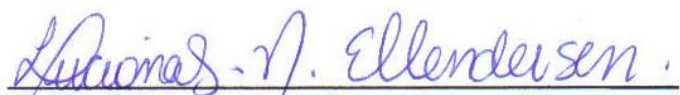
“CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, FÚNGICA E MICOTOXICOLÓGICA
DE MILHO CRIOULO CULTIVADO NA REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS DO
PARANÁ”

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, 23 de abril de 2009.



Profa. Dra. Ana Cláudia Barana
UEPG/PR



Profa. Dra. Luciana de Souza Neves Ellendersen
UEPG/PR



Prof. Dr. Miguel Machinski Jr.
UEM/PR

Ponta Grossa
2009

Dedico aos meus pais, Marcos e Zoli.
E ao meu noivo, Protásio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, energia infinita que sempre guiou e iluminou meus passos.

A professora Dr^a. Ana Cláudia Barana, pela orientação e ensinamentos.

Ao professor Dr^o. David de Souza Jaccoud Filho, pela co-orientação, grande incentivo e sugestões para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao professor Dr^o. Ivo Mottin Demiate, pelo auxílio na realização das análises, colaboração no desenvolvimento da pesquisa e sugestões.

Ao professor Dr^o. Miguel Machinski Junior e ao aluno de mestrado em Agronomia, Odair José Marques, pelo auxílio na realização das análises de cromatografia em camada delgada.

Ao professor Dr^o. Francisco Fanucchi Neto, pelo auxílio e disponibilidade na realização das análises imunológicas.

Ao Dr^o. Milton Domingos Michel, pelo auxílio e total disponibilidade na realização das análises de caracterização mecânica.

À técnica de laboratório MSc. Luciane Henneberg pelo isolamento fúngico nas variedades em estudo.

À minha colega de mestrado Alessandra pela colaboração na realização das análises de caracterização físico-química, bem como as estagiárias Joyce e Jacqueline.

À Dr^a. Rosilene Prestes pela ajuda na interpretação dos dados e análise estatística.

À coordenação, professores e funcionários do Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelo auxílio e ensinamentos.

Às técnicas de laboratório, Denise e MSc. Danianni e a auxiliar de laboratório Rita, por toda a disposição em ajudar e em facilitar esta caminhada.

Aos amigos e colegas de sala de aula e laboratório, Alessandra Pinto, Carmen Voigt, Catherine Carvalho, Edenes Loss, José Ricardo Carvalho, Lorene Anzuategui, Luciana Gabriel, Samantha Gonzalez e Thais Marcon, pelos momentos de convivência e ensinamentos compartilhados.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao projeto BioAgropar/FINEP.

Aos laboratórios do Centro de Tecnologia de Alimentos.

A toda minha família, em especial aos meus pais, meus amores, que nunca mediram esforços para minha formação como pessoa e profissional e meus irmãos Talita e Marcos, pelos anos de convivência e aprendizado.

Ao meu noivo Protásio, pelos anos de apoio e amor dedicado e por entender os motivos de stress e falta de tempo.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Este trabalho teve por objetivos caracterizar variedades crioulas de milho, da região Sul do Brasil, verificando as possíveis relações entre as características apresentadas. Para tanto foram utilizadas vinte variedades crioulas cultivadas na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Ponta Grossa no ano de 2007. As amostras foram caracterizadas através de análises físicas e químicas, bem como foi verificada a contaminação por fungos e micotoxinas, através dos métodos de ELISA e CCD. Além das amostras em grão também foram analisadas amostras de farinha de milho *bijú* e os subprodutos do seu beneficiamento através de análises físico-químicas e de contaminação por micotoxinas. Verificou-se que 60% das amostras de grãos analisados através do método ELISA estavam contaminadas por aflatoxinas totais em níveis de 1,0 a 2,6 ppb, pelo método de CCD não foram encontrados níveis detectáveis de aflatoxinas totais. Verificou-se ainda que 65% das amostras de grãos encontravam-se contaminadas por zearalenona em níveis que variavam entre 64 e 640 ppb e entre 66,9 e 759,3 ppb, pelas metodologias de CCD e ELISA, respectivamente. Das 20 amostras de grãos de milho analisadas, doze mostraram-se positivas para zearalenona pelo método ELISA e treze pelo método de CCD e quatro mostraram-se negativas pelos dois métodos utilizados, sendo necessária a confirmação dos resultados obtidos pelo método de ELISA através do método de CCD. Das variedades analisadas verificou-se que 60% possuíam grãos predominantemente de textura dura e 40% de textura predominantemente intermediária e que quanto maior a proporção de endosperma macio no grão, menor a sua densidade e força de ruptura e maior o seu tamanho. Pode-se perceber ainda que grãos mais pesados possuem um menor diâmetro e que grãos com altos teores de lipídeos e proteínas têm tendência a uma maior densidade e maior força de ruptura. Também foram isolados oito gêneros fúngicos, sendo os de maior incidência *Penicillium* sp e *Fusarium* sp. Verificou-se ainda que as variedades crioulas com uma maior proporção de endosperma macio apresentaram uma maior contaminação por *Fusarium* sp. Todas as amostras analisadas de farinha de milho *bijú* e os resíduos do seu beneficiamento apresentaram contaminação por aflatoxinas totais e zearalenona as maiores contaminações foram verificadas no pericarpo e as menores na farinha de milho *bijú*. Pode-se concluir que para as amostras em estudo não se detectou relação entre a contaminação por micotoxinas e as características físicas, químicas e contaminação por fungos.

Palavras-chave: Milho-crioulo, Micotoxinas, Fungos.

ABSTRACT

This work had for objectives to characterize creole varieties of maize in the South region of Brazil, verifying the possible relations between the presented characteristics. For that were used twenty creole varieties cultivated in the Farm School of the University of Ponta Grossa in the year of 2007. The samples had been characterized through physical and chemical analyses, as well as verified contamination for fungus through the blotter method test and the mycotoxins through the methods of ELISA and HPLC. Beyond the samples in grain flour samples had been also analyzed flour of biju maize and the by-products of its improvement through analyses physicochemistries and of contamination for mycotoxins. It was verified that 60% of the samples of grains analyzed through method ELISA were contaminated by total aflatoxins, total levels 1,0 to 2,6 ppb, for the HPLC method had not been found total aflatoxin levels detectable. It was verified despite 65% of the samples of grains met contaminated by zearalenone in levels that varied between 64 and 640 ppb and 66,9 and 759,3 ppb, for the methodologies of HPLC and ELISA, respectively. Of the 20 samples of analyzed grains of maize, twelve had revealed positive for zearalenone by the method ELISA and thirteen for the method of HPLC and four had revealed negative for the two used methods, being necessary the confirmation of the results gotten for the method of ELISA through the HPLC method. Of the analyzed varieties it was verified that 60% possess predominantly supreme of hard texture and 40% of predominantly intermediate texture endosperm in the grain, minor its density and force of rupture and greater its size. It can be perceived despite supreme heavier they possess a smaller diameter and that grains with high texts of lipids and proteins they have trend to a bigger density and greater rupture force. Also eight fungi sorts had been isolated, being of bigger *Penicillium* incidence sp and *Fusarium* sp. It was verified despite the Creole varieties with a bigger soft ratio of endosperm had presented a bigger contamination for *Fusarium* sp. All maize the analyzed flour samples biju and the residues of its improvement had presented contamination for total aflatoxins and zearalenone the biggest contaminations had been verified in pericarp and the minors in the maize flour biju. Can be concluded that for the samples in study was not detected the relation among the contamination by mycotoxins, and the physical, chemical characteristics and fungus contamination.

Keywords: Creole-maize, Mycotoxin, Fungi.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Teosinto (<i>Tripsacum</i> sp), gramínea que é considerada o parente mais próximo do milho (esquerda) e o milho (direita).....	19
Figura 2 - Do Teosinto (<i>Tripsacum</i> sp) ao milho, alterações importantes que ocorreram durante a domesticação do milho	20
Figura 3 - Diferentes regiões do grão de milho.....	21
Figura 4 - Série histórica da cultura de milho 1 ^a safra.	24
Figura 5 - Série histórica da cultura de milho 2 ^a safra.	24
Figura 6 - Aparência das espigas de diferentes variedades de milho crioulo.	27
Figura 7 - Espiga e grãos de milho com danos por insetos e fungos.....	32
Figura 8 - Danos na espiga de milho causados por <i>Aspergillus</i> sp, <i>Fusarium</i> sp e <i>Penicillium</i> sp.....	33
Figura 9 - Estruturas químicas das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	39
Figura 10 - Diferentes metabólitos produzidos por <i>Fusarium</i> sp.....	42
Figura 11 - Reação antígeno – anticorpo.....	45
Figura 12 - Representação esquemática de um método imunoenzimático (ELISA).....	46
Figura 13 - Detalhe da célula de força durante a compressão do grão.	54
Figura 14 - Teores médios de umidade, proteína bruta, lipídeos, cinzas, fibra alimentar total, fibra bruta e carboidratos disponíveis nas amostras analisadas.....	68
Figura 15 - Frequência de distribuição dos grãos quanto ao seu tamanho, em espessura, largura e comprimento.....	76
Figura 16 - Forças de ruptura, Variedade 1, Variedade 2, Variedade 3 e Variedade 4.....	77
Figura 17 - Forças de ruptura, Variedade 5, Variedade 6, Variedade 7 e Variedade 8.	77
Figura 18 - Forças de ruptura, Variedade 9, Variedade 10, Variedade 11 e Variedade 12.	78
Figura 19 - Forças de ruptura, Variedade 13, Variedade 14, Variedade 15 e Variedade 16.	78
Figura 20 - Forças de ruptura, Variedade 17, Variedade 18, Variedade 19 e Variedade 20.	79
Figura 21 - Médias das forças de ruptura das variedades crioulas de milho analisadas.	81
Figura 22 - Gráficos das correlações consideradas significativas, para as características físico-químicas.....	83
Figura 23 - Gráficos dos escores (G1) e pesos (G2) das amostras de milho crioulo analisadas pela PCA, quanto às características físico-químicas, densidade e força de ruptura.	84

Figura 24 - Dendograma de HCA (análise de componentes hierárquicos) das 20 variedades em estudo.....	86
Figura 25 - Gráficos dos escores (G1) e pesos (G2) das amostras de milho crioulo analisadas pela PCA, quanto às características físicas.....	88
Figura 26 - Percentagem de isolados identificados nos grãos das variedades analisadas.....	93
Figura 27 - Gráfico dos escores (a) e pesos (b) das amostras de milho crioulo analisadas pela PCA, quanto às características físicas, mecânica e contaminação por <i>Fusarium</i> sp e zearalenona.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Percentagem dos constituintes totais indicados nas estruturas físicas específicas do grão de milho.....	20
Tabela 2 - Estimativa do consumo de grãos de milho no Brasil em diferentes setores da economia a partir do ano de 2001.....	21
Tabela 3 - Principais países produtores de milho na safra 2006-2007.....	22
Tabela 4 - Produção de milho por estado em toneladas.....	23
Tabela 5 - Micotoxinas produzidas por diferentes gêneros fúngicos.....	34
Tabela 6 - Alimentos destinados à alimentação humana que foram contaminados por micotoxinas e efeitos tóxicos.....	37
Tabela 7 - Identificação das 20 amostras utilizadas no estudo.....	49
Tabela 8 - Parâmetros utilizados na análise química das amostras de grãos e farinha de milho.....	50
Tabela 9 - Média da composição química das variedades de milho crioulo analisadas.....	62
Tabela 10 - Densidade (g/cm^3) das variedades analisadas, por duas metodologias.....	69
Tabela 11 - Índice de flotação e textura das variedades analisadas.....	70
Tabela 12 - Diâmetro Geométrico médio das partículas das variedades analisadas	71
Tabela 13 - Peso de 1000 grãos (P1000) das variedades analisadas.	73
Tabela 14 - Dimensões dos grãos das variedades em estudo.	74
Tabela 15 - Valores médios de força de ruptura das variedades analisadas.....	79
Tabela 16 - Matriz de correlação entre as variáveis químicas.....	81
Tabela 17 - Matriz de correlação das características físicas dos grãos.	88
Tabela 18 - Matriz de correlação entre dados físicos, químicos dos grãos.	90
Tabela 19 - Percentagem de contaminação fúngica nos grãos.....	92
Tabela 20 - Precipitação pluviométrica (mm) na região de Ponta Grossa, nos meses de outubro 2006 a março 2007.....	94
Tabela 21 - Matriz de correlação entre a contaminação fúngica e características físicas	96
Tabela 22 - Matriz de correlação entre as características químicas e fúngicas.....	99
Tabela 23 - Níveis de contaminação por aflatoxinas totais nas amostras de grão de milho analisadas através das metodologias ELISA e CCD.....	99
Tabela 24 - Níveis de contaminação por zearalenona nas amostras de grãos de milho analisadas através das metodologias ELISA e CCD.....	101
Tabela 25 - Limites permitidos (ppb) de contaminação por zearalenona em alguns países.....	102
Tabela 26 - Comparação entre os resultados obtidos pelos dois métodos de estudo....	103

Tabela 27 - Matriz de correlação entre as características físicas, químicas e contaminação por micotoxinas dos grãos de milho analisados.....	104
Tabela 28 - Matriz de correlação entre a contaminação por fungos e micotoxinas nos grãos analisados.....	105
Tabela 29 - Caracterização química das amostras farinha de milho <i>biju</i>	105
Tabela 30 - Contaminação por aflatoxinas totais e zearalenona na farinha de milho <i>biju</i> e nos subprodutos, pericarpo e gérmen, da produção da mesma.....	106

LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação brasileira de normas técnicas
a.C	Antes de Cristo
BDA	Batata Dextrose Agar
B.O.D	Estufa de demanda biológica de oxigênio
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Food and Agriculture Organization
ha	Hectare
HCA	Análise de Componentes hierárquicos
IAC	Immunoaffinity chromatography
kN	Quilo Newton
Mesh	Número de aberturas por polegada linear
N	Newton
NPK	Relação Nitrogênio/Fósforo/Potássio
PCA	Análise de componentes principais
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RIA	Radio-imuno-assay
RNA	Ácido ribonucleico
SNA	Sociedade Nacional de Agricultura
T	Toneladas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 Geral:	18
2.2 Específicos:.....	18
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1 Milho	19
3.1.1 Milho crioulo	25
3.2 Propriedades físicas do grão de milho	29
3.3 O milho e a contaminação fúngica	32
3.4 O milho e a contaminação por micotoxinas	36
3.4.1 Aflatoxinas	38
3.4.2 Zearalenona	41
3.5 Métodos de detecção de micotoxinas	43
4. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 Coleta e preparo das amostras de grãos de milho.....	48
4.2 Produção da farinha de milho biju.....	49
4.3 Caracterização física e química	50
4.3.1 Caracterização química.....	50
4.3.2 Caracterização física.....	50
4.3.2.1 Densidade utilizando-se picnômetro e xileno.....	50
4.3.2.2 Densidade utilizando balança hidrostática.....	51
4.3.2.3 Índice de flotação (IF)	51
4.3.2.4 Diâmetro Geométrico Médio (DGM).....	52
4.3.2.5 Peso de 1000 grãos	53
4.3.2.6 Dimensões dos grãos	53
4.3.2.7 Força de Ruptura	54
4.4. Caracterização Fúngica	55
4.5 Análises de detecção de micotoxinas	55
4.5.1 Aflatoxinas totais (ELISA).....	55
4.5.2 Zearalenona (ELISA)	57
4.5.3 Aflatoxinas e Zearalenona (CCD)	59
4.6 Análises Estatísticas	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1 Análises nos grãos de milho	62
5.1.1 Caracterização química.....	62
5.1.2 Densidade:	69
5.1.3 Índice de flotação.....	70
5.1.4 Diâmetro geométrico médio (DGM)	71

5.1.5	Peso de 1000 grãos	72
5.1.6	Análise das dimensões dos grãos	74
5.1.7	Análise da força necessária até a ruptura dos grãos	76
5.1.8	Relações entre as características físicas e químicas dos grãos	81
5.1.9	Análises fúngicas	91
5.1.10	Relação entre a contaminação fúngica e as características físicas, químicas e mecânicas dos grãos analisados.....	96
5.1.11	Análises micotoxicológicas	99
5.1.11.1	Aflatoxinas totais	99
5.1.11.2	Zearalenona	101
5.1.12	Relação entre a contaminação por micotoxinas e fungos e as características físicas e químicas.....	113
5.2	Farinha de milho <i>biju</i> e subprodutos	105
5.2.1	Caracterização química da farinha de milho biju.	105
5.2.2	Análises micotoxicológicas na farinha de milho biju e nos subprodutos, gérmen e pericarpo.	106
6.	CONCLUSÕES.....	108
7.	REFERÊNCIAS	109

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*, L) é uma planta originária da América Central, sendo os povos indígenas os primeiros a utilizar este cereal, cultivando e selecionando diversas variedades primitivas (GOODMAN, 1978). Em função do seu potencial nutritivo, constitui em um dos cereais mais cultivados e consumidos (ANDERSON et al., 2000) sendo o Brasil, desde a década de 1990, o terceiro maior produtor mundial de milho (GARCIA et al., 2006).

Comercialmente, no Brasil, estão disponíveis sementes de milho híbridas e crioulas. Embora menos produtivas que as cultivares híbridas e praticamente não comporem as estatísticas da produção nacional de milho, as variedades locais, conhecidas como populações crioulas ou ainda *landraces*, apresentam uma importância significativa para a agricultura familiar no estado do Paraná (PATERNIARI, NASS, SANTOS, 2000). E são assim chamados por serem utilizados por comunidades tradicionais e por possuírem características peculiares como a uniformidade dos grãos e plantas e a sua pureza genética (ZEVEN, 2002).

A dureza e a força de ruptura dos cereais são propriedades que devem ser levadas em consideração no momento da escolha do cultivar de milho pelo produtor (POMERANZ et al., 1984). A importância destas propriedades do grão se deve ao fato de que quanto menor o rompimento do pericarpo da semente, menor a chance de contaminação por microrganismos, especialmente os fungos (MANTOVANI, FONTES, 1989).

Como a maior parte dos cereais, o milho crioulo também pode ser afetado por fungos e seus metabólitos secundários (DINIZ, 2002). Os principais fungos encontrados em milho são pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (MILLER, 1995). Estes fungos toxigênicos podem produzir metabólitos secundários que são

conhecidos como micotoxinas ou toxinas fúngicas que causam sérios danos à saúde humana e aos animais domésticos, além de provocar elevados prejuízos financeiros à exportação, uma vez que existem restrições impostas pelos países importadores de alimentos (LÁZZARI, 2000). As cinco mais importantes micotoxinas em alimentos são: aflatoxina, deoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, fumonisina e ocratoxina A (DINIZ, 2002).

Devido a grande perda de grãos gerada pela presença de micotoxinas, que em 2002 chegava a 25% dos grãos produzidos, justifica-se um estudo da presença e sua quantificação em populações locais, que em geral já são menos produtivas (NASS, ARAÚJO, 2002).

Estudos mais aprofundados em relação à qualidade das sementes produzidas pela agricultura familiar do sul do Brasil servem como estratégia para avaliar, conservar, corrigir, bem como agregar valor à produção e comercialização das variedades locais de milho.

Por isso, as informações geradas nesta linha de estudo pretendem corroborar para uma seleção das variedades mais resistentes ao ataque de fungos e produção de micotoxinas, além de possibilitar um incremento no rendimento da produção de milho crioulo, aumentando a renda proporcionando uma melhora nas condições de vida dos pequenos produtores rurais.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Caracterizar as variedades crioulas de milho quanto às características químicas, físicas e a contaminação por fungos e micotoxinas.

2.2 Específicos:

- Caracterizar física e quimicamente os grãos de vinte variedades de milho crioula e cinco variedades na forma de farinha de milho *biju*;
- Avaliar a contaminação fúngica nos grãos das variedades crioulas em estudo;
- Verificar a prevalência de aflatoxinas e zearalenona nos grãos das variedades crioulas;
- Verificar a prevalência de aflatoxinas e zearalenona na farinha de milho *biju* no gérmen e pericarpo;
- Selecionar as variedades mais resistentes ao desenvolvimento fúngico e a ocorrência de micotoxinas;
- Comparar a eficácia dos métodos de detecção de micotoxinas utilizados;
- Analisar as possíveis correlações existentes entre as características avaliadas nas variedades crioulas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Milho

O milho pertence à ordem *Poales*, família *Poaceae*, gênero *Zea* e a espécie *Zea mays* (DOEBLEY, 1990). O gênero *Zea* é considerado monotípico e constituído por uma única espécie, ou seja, *Zea mays* L (CANECHIO FILHO, 1985). O gênero é composto por gramíneas, algumas perenes, outras anuais, nativas em sua maioria do México e da América Central (DOEBLEY, 1990).

O milho primitivo, existente na costa norte do Peru, variava de tipos alongados de 12 a 20 fileiras de grãos e os da costa sul eram grãos mais arredondados com até 28 fileiras (SILVA et al., 2005). Segundo o Conselho de Informações sobre Biotecnologia-CIB (2006), a mais antiga espiga de milho foi encontrada no vale do Tehucan, na região onde hoje se localiza o México, datada de 7.000 A.C. O Teosinto ou “alimento dos deuses”, como era chamado pelos maias, deu origem ao milho por meio de um processo de seleção artificial (feito pelo homem). O Teosinto ainda é encontrado na América Central (Figura 1).

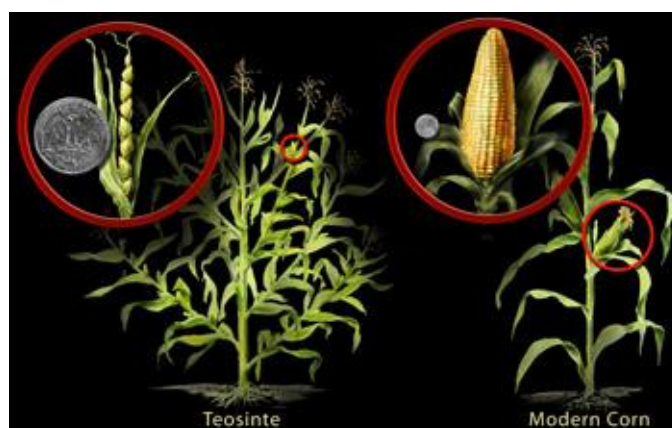


Figura 1. Teosinto (*Tripsacum* sp), gramínea que é considerada o parente mais próximo do milho (esquerda) e o milho (direita).
Fonte: CIB (2006).

Durante o processo de domesticação, o milho deve ter sofrido um processo de introgressão com seus parentes selvagens, aumentando assim a sua diversidade genética

(DOEBLEY, 1990). Na Figura 2 estão apresentadas às alterações que o milho sofreu durante seu processo de domesticação, que passou do Teosinto (1), até o milho moderno (2).



Figura 2. Do Teosinto (*Tripsacum* sp) ao milho, alterações importantes que ocorreram durante a domesticação do milho
Fonte: CIB, (2006)

Os grãos do milho são geralmente amarelos ou brancos, o pericarpo pode apresentar colorações variando desde o preto até o vermelho. O peso individual do grão varia, em média, de 250 a 300 mg e sua composição média em base seca é de 72% de amido, 9,5% de proteínas, 4% de óleo, 1,5% de cinzas e 12% de fibra alimentar total (PAES, 2006; CALLEGARO et al., 2005). Estes constituintes podem variar conforme a região do grão (Tabela 1 e Figura 3).

Tabela 1. Percentagem dos constituintes em base seca indicados nas estruturas físicas específicas do grão de milho

Fração	%	Amido(%)	Lipídeos(%)	Proteínas(%)	Minerais(%)	Açúcares(%)	Fibras(%)
Endosperma	82	98	15,4	74	17,9	28,9	
Gérmen	11	1,3	82,6	26	78,4	69,3	12
Pericarpo	5	0,6	1,3	2,6	2,9	1,2	54
Ponta	2	0,1	0,8	0,9	1,0	0,8	7,0

Fonte: Paes (2006)

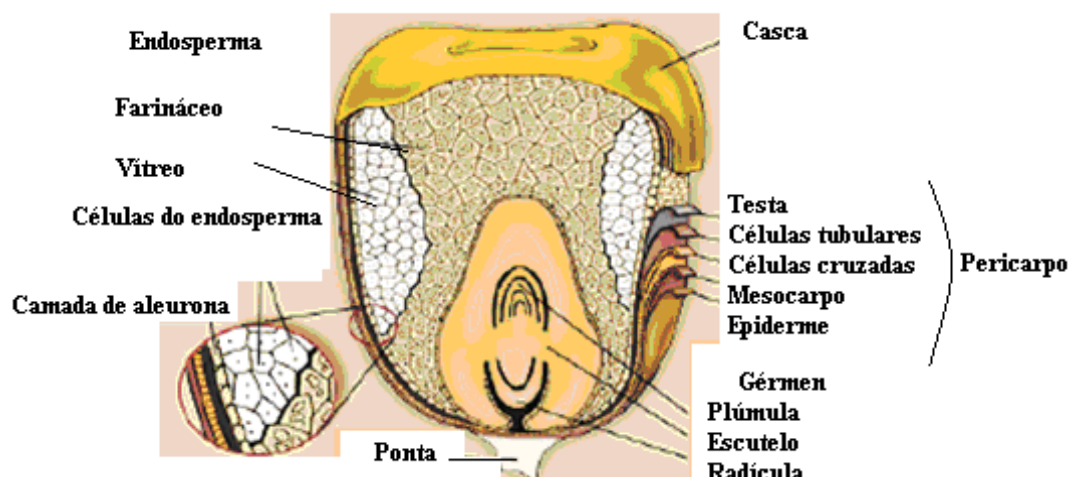


Figura 3. Diferentes regiões do grão de milho.
Fonte: Paes (2006).

O milho é um dos cereais mais consumidos no mundo, participando como matéria-prima em mais de 3500 produtos, como por exemplo: farinha biju, fubá, combustível (FLORIANI, 2007). Segundo CIB (2006) além da sua importância econômica, o milho cumpre papel técnico importante para a viabilidade de outras culturas, como a soja e o algodão, por meio da rotação de culturas, minimizando possíveis problemas com nematóides e algumas doenças (Tabela 2).

Tabela 2. Estimativa do consumo de milho no Brasil em diferentes setores da economia a partir do ano de 2001

Segmento	Consumo (TONELADAS)						
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Animal	26.366	29.112	27.359	28.793	33.680	34.258	35.584
Avicultura	13.479	14.500	15.427	16.162	19.309	20.022	20.515
Suinocultura	8.587	8.930	8.471	8.852	11.236	11.097	12.022
Pecuária	2.772	2.841	1.911	2.198	2.520	2.479	2.374
Outros Animais	1.528	1.543	1.550	1.581	615	660	673
Consumo Industrial	4.050	4.090	4.152	4.256	4.044	4.159	4.369
Consumo Humano	1.505	1.514	1.530	1.568	690	700	705
Perdas/Sementes	998	913	1.660	1.429	296	310	349
Exportação	2.550	1.583	3.988	5.000	869	4.327	5.000
Outros	3.622	3.550	4.809	4.132	-	-	-
Total	39.091	39.464	43.498	45.178	39.579	43.754	46.007

Fonte: FNP Consultoria e Safras & Mercado

A Tabela 2 demonstra a utilização do milho nos diferentes setores da agricultura, onde percebe-se que na safra de 2007, 76% do milho produzido no Brasil foi utilizado para a alimentação animal.

Segundo Paes (2006) e Duarte et al. (2007), 70% do milho produzido no Brasil são utilizados para alimentação animal, e nos Estados Unidos, maior produtor mundial de milho, essa utilização é de 50%. Apesar de não ter uma participação significativa na alimentação humana, o milho é muito utilizado para este fim em países subdesenvolvidos, principalmente em regiões de baixa renda (DUARTE, 2006).

Na safra de 2006/2007 foram produzidos no mundo, aproximadamente 700 milhões de toneladas de milho, sendo os maiores produtores os Estados Unidos, a China, o Brasil e o México, com produção aproximada de 268, 143, 48 e 22 milhões de toneladas, respectivamente (Tabela 3) (FLORIANI, 2007).

Tabela 3. Principais países produtores de milho na safra 2006-2007

Países	Área (ha)	Produtividade (Kg/ha)	Produção (milhões de ton)	Consumo (milhões de ton)	Estoque (milhões de ton)
EUA	28,6	9,36	267,60	241,60	19,10
China	27,0	5,3	143,0	141,0	33,40
Brasil	13,2	3,63	47,9	40,5	4,4
México	7,3	3,01	22,0	29,0	3,6
Argentina	2,9	7,4	21,0	7,0	1,1
SUBTOTAL	79,0	6,35	501,5	459,1	61,6
Outros	67,4	2,84	190,92	269,88	26,35
TOTAL (Mundo)	146,4	4,73	692,42	728,98	87,95

Fonte: Floriani (2007).

Os EUA são os principais produtores mundiais de milho devido, principalmente, a uma maior produtividade quando comparada aos demais países produtores. O Brasil possui grande potencial de produção mas deve aprimorar as tecnologias para aumentar a produtividade deste grão.

Cerca de 90% da produção brasileira é destinada ao mercado interno, sendo os principais exportadores mundiais a Argentina e os Estados Unidos, provavelmente devido a uma melhor logística de transporte (DUARTE et al., 2007). O estado do Paraná lidera a produção de milho no Brasil, conforme se verifica na Tabela 4, seguido pelos estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul, sendo a maior parte da produção nacional concentrada na região sul do Brasil.

Tabela 4. Produção de milho por estado em toneladas.

Regiões	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07
Norte	916.200	855.100	979.200	1.089.700	1.107.800	1.074.600	1.037.385
Nordeste	1.988.300	2.068.400	3.277.500	3.002.600	2.969.400	3.297.000	2.764.491
Sudeste	8.591.900	8.894.400	10.047.700	10.649.100	10.302.800	9.594.200	9.696.042
C. Oeste	8.234.300	7.088.200	9.931.400	9.355.000	7.823.100	9.102.600	8.531.641
Sul	22.559.000	16.374.600	23.175.100	18.032.100	12.803.600	18.613.800	18.799.381
PR	12.374.900	9.363.200	13.657.200	11.192.100	8.414.300	10.887.600	11.245.442
SC	3.947.100	3.105.900	4.234.500	3.340.300	2.818.400	3.178.400	3.098.390
RS	6.237.000	3.905.500	5.283.400	3.499.700	1.570.900	4.547.800	4.455.549
Brasil	42.289.700	35.280.700	47.410.900	42.128.500	35.006.700	41.682.200	40.828.939

Fonte: Abimilho, 2008.

Segundo Garcia et al. (2006), a produção de milho no Brasil é caracterizada pela divisão da produção em duas épocas de plantio. Os plantios de verão, ou primeira safra, são realizados na época tradicional, durante o período chuvoso, que varia entre fim de agosto, na região Sul, até os meses de outubro/novembro, no Sudeste e Centro-Oeste (no Nordeste esse período ocorre no início do ano) e o milho “safrinha”, ou segunda safra, que se refere ao milho de sequeiro, plantado extemporaneamente, em fevereiro ou março, quase sempre depois da soja precoce, predominantemente na região Centro-Oeste e nos estados do Paraná e São Paulo.

Na safra agrícola de 2006/2007 a área cultivada com milho no Brasil (1ª e 2ª safra) foi de 13,2 milhões de hectares, superior à da safra 2005/2006 em 6,9%, tendo sido cultivados 893,7 mil hectares a mais (CONAB, 2007) (Figuras 4 e 5).

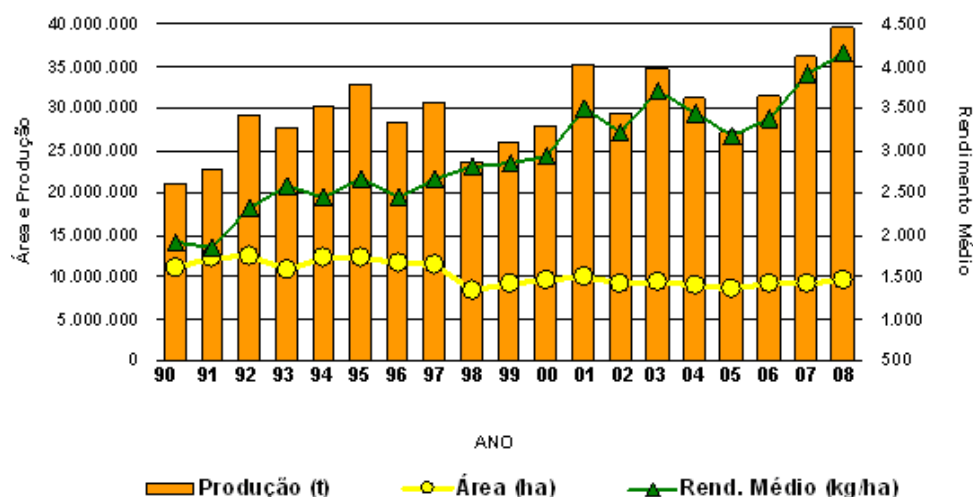


Figura 4. Série histórica da cultura de milho 1ª safra.

Fonte: IBGE, 2008.

Na Figura 4 encontra-se a série histórica da cultura de milho da 1ª safra no período de 1990 a 2008. Nota-se uma estabilidade da área plantada e variação da produção e rendimento que, segundo IBGE, é função das condições climáticas.

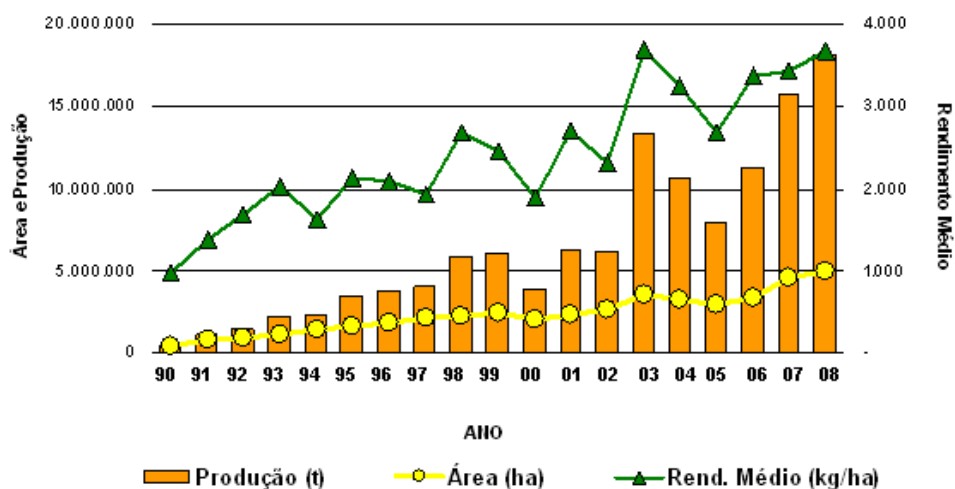


Figura 5. Série histórica da cultura de milho 2ª safra.

Fonte: IBGE, 2008.

Apesar de sua grande importância, no Brasil e no Paraná a produtividade média de grãos por unidade de área ainda pode ser considerada baixa em relação ao potencial genético das cultivares que hoje existem no mercado (BOBATO, 2006).

Um dos fatores desta baixa produtividade é o grande número de pequenos produtores que quando comparados aos grandes produtores, se preocupam menos com o rendimento da cultura e possuem um grau menor de tecnologia. Percebe-se isso através

dos dados apresentados por Duarte (2006), em que 94,3 % dos produtores de milho são responsáveis por 30 % da produção, usando 45,63 % da área destinada ao cultivo desse cereal no país. Por outro lado, 2,4 % dos produtores cultivam 43,91 % da área e produzem 60,08 % do milho colhido no Brasil.

Segundo Cruz e Pereira Filho (2008), das 302 cultivares de milho comercializadas no Brasil em 2008, 28 são de milho crioulo, ou variedades locais.

3.1.1 Milho crioulo

É considerado como crioulo ou variedade local o milho que teve seu melhoramento genético limitado a intervenções manuais, sendo cultivadas por comunidades tradicionais, distintas geograficamente ou ecologicamente, diversas em sua composição genética, bem como adaptadas à condição agro-climática local (CAMPOS, 2006, TRINDADE, 2006 e OGLIARI et al., 2007).

O resgate de variedades crioulas representa a possibilidade real de ampliação da base genética nos cultivos, bem como a conquista de autonomia pelos agricultores quanto a esse insumo básico (PADOVAN et al., 2007).

Como a produção de milho é parte integrante e fundamental na matriz produtiva, se torna fundamental a busca de alternativas como a produção de milho crioulo, para reduzir custo de produção e reduzir a dependência de insumos externos (SANGALETTI, 2007).

Segundo Abreu; Canti e Juriatti, (2007), as tecnologias com o uso de variedades crioulas são a melhor alternativa para a sustentabilidade dos pequenos agricultores, pois o melhoramento destas variedades pode ser feito em campo pelos próprios produtores que, na maioria das vezes, detêm grande conhecimento destes materiais crioulos.

Para Trindade (2008), as sementes crioulas são as que melhor se adaptam à região onde ocorrem, visto que elas se aperfeiçoaram por meio da seleção natural, na

qual os indivíduos mais vigorosos permanecem. Pode-se somar a essa constatação o fato de que, com a utilização das sementes crioulas, o agricultor de comunidades tradicionais pode armazenar sementes de uma safra para outra.

O reaproveitamento, safra após safra, de sementes colhidas em plantas selecionadas nas condições ambientais e nutricionais impostas pelo nível socioeconômico do agricultor, proporciona o desenvolvimento de populações de milho adaptadas a diferentes situações (MIRANDA et al., 2007).

Além dos benefícios citados, o uso de sementes crioulas possibilita aos agricultores familiares reduzir custos de produção, diminuir significativamente o uso de agroquímicos e aumentar a renda através da redução da compra de sementes e aumentar a receita através da venda de sementes produzidas (SANGALETTI, 2007). O cultivo do milho crioulo pelas comunidades tradicionais tem princípios sustentáveis, permitindo maior equilíbrio entre cultivo e meio ambiente (TRINDADE, 2008).

A partir do Plano de Ação Global, elaborado na 4ª Conferência Técnica Internacional para Recursos Genéticos de Plantas (Alemanha, 1996), houve um maior reconhecimento da comunidade científica quanto ao papel dos pequenos agricultores na conservação, desenvolvimento e uso dos recursos genéticos locais (SOARES et al., 1998).

Da produção mundial de grãos, estudos estimam que cerca de 30% do arroz, 70% do feijão e 49% do milho venham da agricultura familiar (CÂMARA, 2005).

As unidades de agricultura familiar são compostas por diversos grupos que possuem tecnologias e organização diferenciadas, esta diversidade explica o porquê de muitos agricultores manterem as sementes crioulas (MENEGUETTI; GIRARDI; REGINATTO, 2002).

A utilização da tecnologia recomendada pelas grandes empresas está fora do alcance de alguns pequenos produtores, já que estas tecnologias levam esses produtores a uma dependência das empresas que detêm o poder sobre os insumos (fertilizantes, sementes e agrotóxicos) (ABREU, CANSI; JURIATTI, 2007). Paulus e Machado Neto (2001) citam que uma forma de evitar a compra e a dependência por sementes híbridas é utilizar as sementes crioulas.

No período de 1993 a 2000 foram identificadas na região do centro-sul do Paraná 112 variedades de milho crioulo (ALMEIDA; TARDIN; PETERSEN, 2007). Segundo Canci (2002), podem existir de 50 a 100 mil variedades de milho crioulo no mundo.

Podem-se citar alguns exemplos de variedades de milho crioulos mais tradicionais como a Caiano, Cunha, Dente-de-cão, Palha roxa e ainda algumas que passaram por algum melhoramento através de pesquisa como BR S Planalto, BR S Sol da Manhã, BR S 4150, BR 106, BR 451 QPM, BR 473 QPM, BR 5202 Pampa, AL 25, AL 30, AL 34, AL Mamdur, FUNDACEP 34, FUNDACEP 35 e a RS 21 (PAULUS; MACHADO NETO, 2001).

Existe ampla variação de características das variedades de milho crioulo, um exemplo é mostrado na Figura 6.



Figura 6 - Aparência das espigas de diferentes variedades de milho crioulo.
Fonte: Silva et al. 2005.

Em um estudo realizado por Abreu; Canti e Juriatti (2007), comparando-se testes de germinação e rendimento de 20 variedades locais com 5 híbridas, verificou-se que 3 das 20 variedades locais não diferiram estatisticamente das híbridas, sendo assim uma alternativa rentável.

Miranda et al. (2007) analisaram 11 variedades locais de milho crioulo quanto às características na cariopse, cor da coroa, cor do endosperma, cor do pericarpo; na espiga, a forma e o comprimento; nas fileiras de grãos, o número e a direção; e nos grãos o tamanho e o tipo, verificando que a cor da coroa variou de branco-amarela a amarelo-alaranjada; a cor do endosperma variou de amarela a amarelo-alaranjada e a do pericarpo de incolor a amarela; a forma da espiga variou entre cônica e cônico-cilíndrica, o comprimento entre 11,2 e 21,56 cm e a direção das fileiras foi de reta a levemente curvada; o tipo de grão foi semi-dentado ou dentado e o seu tamanho foi de pequeno a grande. As espigas das variedades crioulas são maiores que das híbridas, aumento necessário para compensar a pequena população de plantas.

Ainda segundo Miranda et al. (2007), há uma variação intra e interespecífica entre as variedades de milho crioulo analisadas.

Ogliari et al. (2007) analisando 25 variedades crioulas de milho quanto a número de plantas acamadas e quebradas, número de plantas e espigas colhidas, peso total de espigas da parcela útil com e sem palha, peso total do sabugo da parcela útil, peso de 1000 sementes, peso hectolitro, peso de grãos (umidade 13%), prolificidade e o rendimento de grãos, chegaram a conclusão que existem diferenças significativas entre as variedades quanto as características em estudo, isto significa que existe grande diversidade entre as variedades locais, associada a maioria das variáveis analisadas.

3.2 Propriedades físicas do grão de milho

A qualidade do grão está associada, tanto com sua constituição física, que determina sua textura e dureza, quanto a sua composição química, que define o valor nutricional e as suas propriedades tecnológicas. A importância relativa destas características resultará no destino da produção (INTA-BALCARCE, 2008).

Cada processo a que se destina o milho merece um tipo especial de grão e esta classificação pode estar relacionada com a sua dureza (SALINAS, MARTINEZ; GOMEZ, 1992).

O termo dureza dos grãos de milho é utilizado com dois diferentes significados, composição física dos grãos relacionada à textura do endosperma, que varia de dura até macia devido aos diferentes arranjos dos grânulos de amido e força requerida para quebrar os grãos, que é uma propriedade mecânica relacionada à suscetibilidade à quebra (PAULSEN, HILL, 1985; ECKHOFF; PAULSEN, 1996).

A dureza do grão pode ser considerada como a resistência que este possui a ação mecânica ou a quebra durante a colheita ou pós-colheita. É esta resistência que determina a qualidade que o grão possui para seu uso e conservação e está relacionada de forma direta com a dureza do endosperma, que por sua vez, se deve a relação entre os endospermas duro e macio e, em menor proporção, à compactação dos componentes celulares, ao tamanho da matriz protéica que rodeia os grânulos de amido e ao tamanho do pericarpo. A sua dureza será maior quanto maior a quantidade de endosperma duro em sua composição (INTA BALCARCE, 2008).

O endosperma é constituído por grânulos de amido rodeados e envolvidos fortemente por uma matriz protéica, sendo a compactação o fator mais importante da microestrutura relacionado à dureza dos grãos de milho. Grãos muito compactos tendem a ser duros, apresentando valores altos de proteína e pericarpo espesso, mas com baixos

valores de conteúdo de amilose, peso e tamanho de grãos (NARVÁES-GONZALEZ et al., 2006).

O endosperma do milho pode ser classificado em dois tipos: macio e duro. No primeiro, os grânulos de amido são arredondados e estão dispersos, não havendo matriz protéica circundando essas estruturas, o que resulta em espaços vagos durante o processo de secagem do grão, a partir dos espaços onde antes era ocupado pela água, durante o desenvolvimento do grão. Por outro lado, no endosperma duro, a matriz protéica é densa, com corpos protéicos estruturados, que circundam os grânulos de amido de formato poligonal, não permitindo espaços entre estas estruturas (PAES, 2006). González et al. (2005) e Salinas; Arellano e Martinez, (1992) verificaram que as amostras com maior teor protéico eram também as que possuíam um endosperma com características predominantemente dura. O endosperma cristalino do milho duro apresenta alto teor de proteína, que atua como um “cimento natural”, formando uma estrutura rígida no grão. O milho com endosperma macio apresenta um menor teor de proteína, menor tamanho médio de partícula na farinha, maior tamanho do grão, forma aplanada e farinha de coloração mais clara (SALINAS; ARELLANO; MARTINEZ 1992).

Martinez e Guiragossian (1989) citam que a dureza do milho é dependente das características físicas e químicas do grão, estando também relacionada com as condições a que os grãos são submetidos durante o transporte e armazenamento.

A força de ruptura é definida como o potencial de fragmentação ou quebra do grão quando sofre força de impacto (ECKHOFF; PAULSEN, 1996). Estes impactos podem ocorrer durante o transporte, à manipulação e no momento da comercialização. A força de ruptura não está associada necessariamente com a dureza dos grãos. Em

locais de clima temperado, a relação entre a dureza e a suscetibilidade à quebra dos grãos tem sido fraca (KNIEP, MASON, 1989).

De acordo com Andrade et al. (1999), a qualidade da semente é afetada, principalmente, pela injúria mecânica, constituindo-se em um problema praticamente inevitável, pois todas as etapas do processo produtivo podem gerar danos devido aos golpes aplicados sobre as sementes, com a finalidade de separá-las das espigas. Vários fatores, físicos e biológicos, podem contribuir para que o processo de deterioração do milho se instale e se acentue sempre que o pericarpo é rompido por um processo mecânico, como a colheita, a debulha, a limpeza e outros processos (KNIEP; MASON, 1989).

Algumas análises podem ser empregadas para estimar de modo indireto a dureza do milho, uma delas é o índice de flotação ou de grãos boiantes que, segundo Wilhelm et al. (1999), estima de modo indireto a proporção de endosperma duro e macio presente no grão. O índice de flotação e o peso hectolitro correlacionam-se com a dureza do milho (SALINAS; ARELLANO; MARTINEZ 1992). Segundo Pomeránz et al. (1984) e González et al. (2005), quanto menor o índice de flotação maior é a dureza do genótipo nas amostras analisadas.

Duarte et al. (2007) sugerem que a força de ruptura não está associada com a densidade dos grãos em híbridos de milho cultivados em condições de safrinha, não havendo correlação entre a produtividade e a qualidade física dos grãos.

Quanto menor for a chance de rompimento do pericarpo do grão de milho, menos portas de entradas para microrganismos vão existir, especialmente para os fungos (MANTOVANI; FONTES, 1989).

3.3 O milho e a contaminação fúngica

Devido à grande importância da cultura de milho, produz-se milho em todas as regiões do Brasil, fazendo com que a cultura permaneça no campo durante praticamente o ano todo, o que gera uma produção permanente de inóculo dos mais diversos patógenos que afetam a cultura, como os grãos são pagos pela qualidade, uma queda neste fator afetaria o ganho do produtor (SILVA; SCHIPANSKI, 2006 e LÁZZARI, 2000).

Em estudo realizado por Dilkin et al. (2000), foi observado que 38% do milho recém-colhido apresentou ação degenerativa, compreendendo os grãos por desenvolvimento de insetos (26,7%) e desenvolvimento fúngico (11,3%). O efeito dos grãos atacados por insetos foi estatisticamente superior aos grãos com desenvolvimento fúngico em todos os híbridos. Apesar de encontrar alta incidência de fungos no milho recém-colhido e umidade média de 18%, não foram detectadas micotoxinas. Isso pode ser atribuído ao curto espaço de tempo para a formação das mesmas, ou número reduzido de linhagens fúngicas com potencial toxigênico. Dilkin et al. (2000) verificaram ainda que a presença de *Fusarium* sp nos híbridos de milho recém-colhidos foi significativamente superior aos gêneros *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp.

Segundo Pinto (2006), os fungos sempre estão presentes nos grãos armazenados, sendo os insetos os principais causadores da deterioração durante o armazenamento (Figura 7).



Figura 7 - Espiga e grãos de milho com danos causados por insetos e fungos
Fonte: Pinto, 2006.

Segundo Cruz e Pereira Filho (2006), os grãos de milho podem ser danificados por fungos no período de pré-colheita (podridões da espiga) e pós-colheita, durante a armazenagem, transporte e beneficiamento.

Os fungos são disseminados por esporos, sendo que os disseminadores são os insetos. Os principais fungos que atacam a cultura do milho são o *Fusarium* (Figura 8b) e o *Helminthosporium*, que são conhecidos como fungos de campo (hidrofílicos) e requerem uma umidade superior a 20%, para o seu desenvolvimento. Os fungos considerados de armazenamento (xerofílicos) que são principalmente o *Aspergillus* (Figura 8a) e o *Penicillium* (Figura 8c), que contaminam os grãos após a colheita, têm a capacidade de viver associados a grãos com teor de umidade mais baixo, 13 a 13,5%, e temperaturas mais elevadas, 25° C (PINTO, 2006).

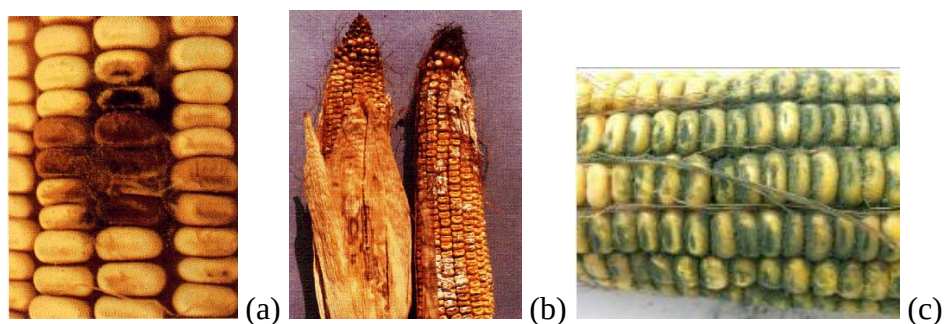


Figura 8 - Danos na espiga de milho causados por *Aspergillus* spp (a), *Fusarium* sp (b) e *Penicillium* sp (c).

Fonte: Woloshuk, 2008 e Tenuta, 2008.

Em um estudo realizado por Pozzi et al. (1995), em 130 amostras de milho, foi detectada a presença de *Fusarium* sp (83,8%), *Penicillium* sp (55,3%), *Aspergillus* sp (40,7%), além de outros 11 fungos filamentosos. Registrou-se ainda a presença de micotoxinas: Aflatoxinas, Ocratoxina A, Esterigmatocistina, Zearalenona, Deoxivalenol e Fumomisin B1.

Atehnkeng et al. (2007) analisaram 20 amostras de milho em grão da Nigéria quanto à presença fúngica, encontrando cinco diferentes gêneros de fungos, sendo esses

o *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Macrophomina*. *Aspergillus* foi o gênero identificado em maior proporção.

Janardhana; Raveesha e Shetty (1999) analisaram 197 amostras de milho encontrando uma contaminação fúngica de *Aspergillus flavus* (55-62%), *A. flavus columnaris* (30-50%), *A. candidus* (30-33%), *A. fumigatus* (18-33%), *A. terreus* (10-11%), *Penicillium* sp (53-100%), *F. moniliforme* (50-83%) e *Trichoderma* sp (30-80%).

Fungos contaminantes do milho podem ser toxigênicos, isto é, possuem a capacidade de produzir toxinas, que causam danos ao organismo quando consumidas e são conhecidas como micotoxinas (Tabela 5).

Tabela 5. Micotoxinas produzidas por diferentes gêneros fúngicos.

Micotoxinas	Gêneros produtores
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</i> spp. <i>Myrotherium</i> sp. <i>Trichothecium</i> sp. <i>Calonectria</i> sp. <i>Stachybotrys</i> sp. <i>Cephalosporium</i> sp. <i>Verticimonosporium</i> sp.
Deoxinivalenol (DON)	<i>Fusarium roseum</i> ; <i>F. graminearum</i>
Zearalenona	<i>F. graminearum</i> e outros <i>Fusarium</i> spp.
Fumonisinias	<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</i> spp.
Ácido ciclopiazônico	<i>A. flavus</i> ; <i>A. tamarii</i> ; <i>P. commune</i>

FONTE: Serra, 2005.

Na Tabela 5 percebe-se que existe um grande número de fungos que podem produzir micotoxinas e trazer riscos para a saúde animal e humana. A contaminação por fungos pode acarretar diversos problemas de saúde e de ordem econômica, que compreendem as perdas diretas de produtos agrícolas, perda de animais por morte, doenças humanas, perda da produtividade de animais, rejeição do produto pelo mercado nacional e internacional (DINIZ, 2002).

A penetração pelos fungos no grão ocorre com a germinação dos esporos, emissão do pró-micélio e a formação dos apressórios, que se fixam na superfície do hospedeiro e no ponto de contato, sobre os sítios de infecção, onde ocorre a dissolução do tecido e a formação de orifício microscópico. Essa ação envolve enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e pectinolíticas (BENSCH; VAN STADEN; RIJKENBERG, 1992). Segundo Pantaleón et al. (1988), a contaminação do grão pelos fungos pode ocorrer através do pedúnculo do grão, por injúrias na superfície do grão e ainda via estigmas. Alguns fatores podem facilitar a contaminação, como a temperatura, umidade relativa do ar, umidade do substrato, concentração de oxigênio, presença do fungo e tempo de armazenamento (LÁZZARI, 2000).

Segundo Marques (2007), a contaminação fúngica e a provável produção de micotoxinas estão relacionadas com fatores climáticos durante o desenvolvimento do grão no campo e durante a armazenagem. Em cereais estocados, os fatores mais importantes para o crescimento de fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus* e produção de aflatoxinas são a umidade relativa do ar e do substrato e a temperatura de armazenagem. O crescimento fúngico dificilmente ocorre em cereais que apresentam umidade inferior a 12% (REDDY, 1992).

3.4 O milho e a contaminação por micotoxinas

Micotoxina ou toxina fúngica é um termo usado para definir o composto altamente tóxico, que é produzido por fungos que infectam produtos e subprodutos agrícolas, como o milho (LÁZZARI, 2000 e SABINO; INOMATA; LAMARCO, 1982). As micotoxinas estão freqüentemente envolvidas na contaminação de produtos agrícolas. As principais encontradas em rações são aflatoxinas, desoxinivalenol, nivalenol, zearalenona e fumonisinas (BAPTISTA; HORII; BAPTISTA, 2004). Vários esforços vêm sendo realizados para quantificar a extensão da exposição humana a esses agentes, relacionando com a cadeia alimentar, ou seja, através de produtos que se destinam ao uso humano e animal (PEREIRA; TOLEDO, 1995).

Na Tabela 7 pode-se verificar o grande impacto que a contaminação por micotoxinas pode causar à saúde do homem e animais, verifica-se também que os cereais são os alimentos que apresentam o maior índice de contaminação. Segundo Goodman (2004), muitos alimentos são suscetíveis ao ataque de fungos durante a produção e estocagem e muitos destes fungos produzem micotoxinas.

A contaminação por micotoxinas ocorre no campo durante o desenvolvimento do milho devido ao ataque de insetos, durante a fase final do amadurecimento devido às condições climáticas e durante o armazenamento, quando o produto é estocado com excesso de umidade (DINIZ, 2002). A intoxicação por micotoxinas é conhecida como micotoxicose, os órgãos mais afetados são o fígado, rins, cérebro e sistema nervoso e os sintomas vão desde vômitos e náuseas até a morte (DINIZ, 2002).

Tabela 6. Alimentos destinados à alimentação humana que foram contaminados por micotoxinas e efeitos tóxicos

Micotoxina	Ocorrência em Alimentos	Efeitos patológicos causados pela micotoxina
Aflatoxinas (B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂)	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 M ₁	Leite	Semelhante a aflatoxina B ₁
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
Ocratoxina A	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.
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
Tricotecenos (toxina T-2, diacetoxiscirpenol, neosolaniol, nivalenol, diacetilnivalenol, desoxinevalenol, toxina HT-2, fusarenona X)	Milho, trigo, cevada, aveia.	Perturbações digestivas (diarréia, 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.
Fumonisinás	Milho e derivados, chá preto.	Leucoencefalomalacia e edema pulmonar; carcinogênese (câncer do esôfago).

FONTE: Cast (2003).

O desenvolvimento fúngico e a produção de micotoxinas ocorrem devido a diversos fatores estressantes para a planta (PAYNE, 1992). Esses fatores, segundo Abbas et al. (2002), podem ser baixa quantidade de umidade no solo, grande variação de temperatura e baixa quantidade de nutrientes no solo. Outros fatores, além dos já citados, que podem afetar a produção de micotoxinas principalmente por espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são a atividade de água, pH, atmosfera,

competição microbiana, danos causados por insetos e linhagem do fungo contaminante (SCUSSEL, 1998).

3.4.1 Aflatoxinas

As aflatoxinas são produtos do metabolismo secundário de fungos, predominantemente de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius* (ELLIS et al., 1991). O termo aflatoxina é derivado de *Aspergillus* (A-) *flavus* (-fla-) e toxina, pois se pensava que a aflatoxina era produzida somente por este fungo (SALEEMULLAH; IQTIDAR; HAMIDULLAH, 2006). São substâncias altamente ionizáveis e por isso muito reativas, podendo modificar o DNA, o RNA e as proteínas celulares; são moléculas termorresistentes, não sendo destruídas pelos processos convencionais de esterilização. Por outro lado, são eliminadas juntamente com o resíduo do processo, durante o processo de refino, na produção de óleos (BROGERAS, 2007).

O descobrimento das propriedades hepatotóxicas e hepatocarcinogênicas de algumas linhagens de *A. flavus* e *A. parasiticus*, seguida pela elucidação da estrutura de seus metabólitos tóxicos, ocorreu no início da década de 1960, dando novo enfoque e prioridade para a pesquisa sobre micotoxinas (SANTURIO, 2000).

O motivo do estudo intenso e da descoberta das aflatoxinas foi a mortalidade de perus na Inglaterra. Essas aves ingeriram aflatoxinas através de torta de amendoim de origem brasileira contaminada com *A. parasiticus*, a doença foi chamada de "*turkey - X disease*" (SANTURIO, 2000). Segundo Sargeant (1961), durante o surto em 1960 uma análise química foi realizada na torta de amendoim, encontrando-se uma série de compostos tóxicos que apresentavam fluorescência sob luz ultravioleta. Entre estes compostos que apresentam fluorescência sob luz ultravioleta, os que são produzidos naturalmente e em maior quantidade são as aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) (SANTURIO, 2000) (Figura 9); as aflatoxinas designadas pela letra B, são assim chamadas devido a

sua fluorescência fortemente azul (*blue*) sob luz ultravioleta e as designadas pela letra G, devido as sua fluorescência verde (*green*) amarelada sob luz ultravioleta (WOGAN; BUSBY, 1980).

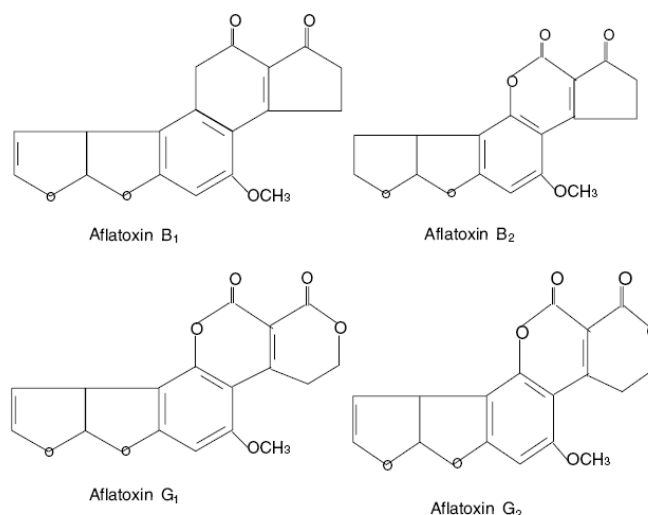


Figura 9 - Estruturas químicas das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.
Fonte: Saleemullah; Iqtidar e Hamuidullah (2006).

As condições ideais para a produção de aflatoxinas em cereais são umidade relativa do ar de 80 a 85%, 17% de umidade no grão e temperatura de 24 a 35°C (LEESON et al., 1995).

Zeringue; Brown e Neucere (1996) sugerem que as variações nas concentrações de aflatoxinas (AFs) encontradas em diferentes híbridos de milho estejam relacionadas à concentração de ácido linoleico e da enzima lipoxigenase. A lipoxigenação do ácido linoleico seria capaz de produzir aldeídos voláteis com cadeias de 6 até 12 carbonos, inibindo ou impedindo o crescimento de fungos e a formação de AFs.

Segundo Correa et al. (2000), a contaminação por aflatoxinas em milho tem sido descrita principalmente em milho em grão, acarretando grandes impactos na economia mundial, pois o milho em grão é amplamente utilizado na alimentação animal (CARDWELL et al., 2000).

Devido ao acentuado risco à saúde humana, a legislação brasileira estabelece limites de detecção de aflatoxinas $B_1+B_2+G_1+G_2$ em milho grão de 20 $\mu\text{g/kg}$ (BRASIL, 2002). Em animais, a aflatoxicose pode causar redução no ganho de peso, baixa resistência a doenças, hepatite e até mesmo a morte (WOLOSHUK, 1994).

Os limites recomendados pela FDA (Food and Drug Administration) para alimentação animal são de 20 ppb para vacas leiteiras e 100 ppb para o gado, suínos e aves domésticas (WOLOSHUK, 1994).

Kawashima e Valente-Soares (2006) analisaram 74 amostras de produtos à base de milho no Brasil, verificando a presença de aflatoxinas em 5 das 74 amostras. Amra (2007) detectou em amostras de milho nacional (Egito) e importado colhidos nas estações de inverno e verão, uma contaminação de 10% de aflatoxinas durante o inverno. As concentrações de aflatoxina B_1 variaram de 5,8 a 7,5 $\mu\text{g/Kg}$. Durante o verão a incidência de aflatoxinas foi de 12,5%, sendo que as concentrações de aflatoxina B_1 variaram de 4,2 a 5,3 $\mu\text{g/Kg}$.

Ainda em um estudo realizado por Correa et al. (2000), com 600 amostras de milho provenientes do estado do Paraná, Goiás, Mato Grosso do Sul, Argentina e Paraguai, 56% das amostras analisadas estavam contaminadas com aflatoxinas. Abdulkadar; Absulla e Al-Jeadh (2002) observaram contaminação por aflatoxinas totais em concentrações que variaram de 1,0 a 20 $\mu\text{g/kg}$ em três das 54 amostras de milho analisadas provenientes do Catar (Península arábica).

Bittencourt et al. (2005) não verificaram a contaminação por aflatoxinas em 60 amostras de alimentos a base de milho. Machinski Jr et al. (2001) analisaram 110 amostras de produtos derivados de milho quanto à presença de micotoxinas, sendo que 54% das amostras estavam contaminadas por aflatoxinas, das quais 11% estavam contaminadas por AFG_1 e AFG_2 além da AFB_1 e da AFB_2 .

Janardhana; Raveesha e Shetty (1999) analisaram 197 amostras de milho quanto à presença de aflatoxina B₁, encontrando uma incidência de 17,7% de amostras contaminadas. Em um estudo realizado por Abbas et al. (2006) em 21 híbridos de milho quanto à presença de aflatoxinas, foi verificada uma contaminação de 84,2% das amostras por aflatoxina B₁ e de 10,2% das amostras por aflatoxina B₂.

Em outro estudo realizado por Gloria et al. (2004) 20 das 22 amostras de milho analisadas estavam contaminadas com níveis detectáveis de aflatoxinas totais.

Hashimoto et al. (2003) analisaram amostras de milho para alimentação animal quanto às características físico-químicas e micotoxicológicas, verificando que nas amostras com um maior teor protéico, ocorreu também a maior contaminação por aflatoxinas.

3.4.2 Zearalenona

Zearalenona (ZEA) é uma micotoxina produzida por *Fusarium roseum*, *Fusarium verticillioides* (sin. *F. moniliforme*) e *Fusarium graminearum* (WITTE; HOOSER, 2008). É encontrada mundialmente, mas em maior proporção nas regiões temperadas da Ásia, Europa e América em cereais como o milho, cevada, aveia e o sorgo (WITTE; HOOSER, 2008).

Os fungos responsáveis pela produção de ZEA também produzem, em condições específicas, outras micotoxinas não estrogênicas, como o desoxinivalenol (DON) e a toxina T2 (WITTE; HOOSER, 2008).

Frequentemente, DON e ZEA ocorrem conjuntamente. No grão armazenado, a produção destas micotoxinas é favorecida em condições de umidade do grão superior a 20,5% e temperaturas de cerca de 20 a 30°C. Como ocorre com a DON, o crescimento do fungo que produz ZEA cessa se o grão é seco até uma umidade $\leq 15\%$ (WOLOSHUK, 1994).

ZEA é considerado um composto estrogênico, a sua estrutura não é similar aos compostos esteróides, mas produz as respostas no útero ou no oviduto mamífero, que são similares àsquelas produzidas por hormônios estrogênicos, tais como o estradiol (COLOMBE JR, 1993). Os efeitos tóxicos da ZEA e dos seus metabólitos derivam principalmente de suas propriedades estrogênicas, interagindo assim com os receptores humanos para os hormônios estrogênicos, competindo assim com o 17 β -estradiol (BRIONES-REYES; GÓMEZ-MARTINEZ; CUEVA-ROLÓN, 2007).

Existem diferentes intermediários de ZEA produzidos por *Fusarium* sp, destacando-se, α -zearalenol (α -ZOL), β -zearalenol (β -ZOL), α -zearalanol (α -ZAL), β -zearalanol (β -ZAL) e zearalenona (ZEA) (Figura 10); somente ZEA e a α -ZOL foram detectadas em cereais contaminados (URRACA; MARAZUELA; MORENO-BONDI, 2004).

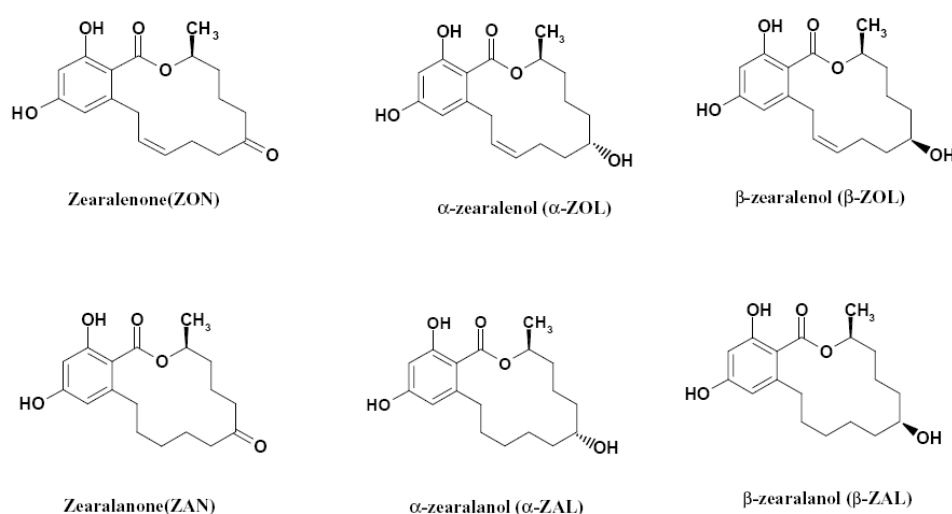


Figura 10 - Diferentes metabólitos produzidos por *Fusarium* sp
Fonte: Urraca; Marazuela e Moreno-Bondi, (2004).

Os suínos são os mais sensíveis e afetados pela contaminação por ZEA (COLOMBE JR, 1993). Uma grande variedade de efeitos clínicos atribuídos a ZEA foi descrita na literatura. A diminuição da fertilidade, ciclos anormais de fertilidade,

produção de leite reduzida e o aumento da glândula mamária são os sintomas mais comuns em bovinos e suínos (WITTE; HOOSER, 2008).

Em níveis normalmente encontrados em rações comerciais, não ocorreram alterações no consumo alimentar, ganho de peso, produção ou qualidade de ovos, nem nos parâmetros bioquímicos e hematológicos do sangue, aspecto micro e macroscópico dos tecidos e no comportamento das aves (BOCK et al., 1986). Com concentrações elevadas ou toxicose induzidas em perus machos, os sinais clínicos não foram específicos, mas incluiu redução na conversão alimentar, pequena alteração no peso dos órgãos, redução na fertilidade e mudança no comportamento das aves (BOCK et al., 1986).

Em um estudo realizado por Amra (2007), onde foram analisadas 40 amostras de milho nacional e importado quanto à contaminação por ZEA, durante o inverno e o verão no Egito, foi verificado que durante o inverno houve uma contaminação de 5% das amostras analisadas, com uma concentração de 5,7 a 8,7 $\mu\text{g/kg}$ e no verão essa contaminação subiu para 7,5%, com uma concentração de 7,4 a 9,4 $\mu\text{g/kg}$. Machinski Jr et al. (2001) analisaram 110 amostras de milho no Brasil quanto a presença de ZEA, sendo que esta foi detectada em 1% das amostras na concentração de 4640 $\mu\text{g/kg}$. Janardhana; Raveesha e Shetty (1999), analisando a presença de ZEA em 197 amostras de milho na Índia, encontraram uma incidência de 9,6% com concentrações que variaram de 10 a 41 $\mu\text{g/kg}$.

3.5 Métodos analíticos para micotoxinas

Vários métodos podem ser utilizados na detecção e quantificação de micotoxinas em alimentos e, quando possível, em tecido muscular, leite, urina, soro, fezes e sangue. Os métodos existentes baseiam-se em alguma medida física ou característica química

das mesmas, como absorção na região do ultravioleta, fluorescência ou mudança de cor quando ocorre alguma reação química (SABINO, 1995).

Dentre os principais métodos utilizados para a análise de micotoxinas, estão os imunológicos e os cromatográficos. Dentre os cromatográficos os principais são em camada delgada (CCD) e a líquida de alta eficiência (CLAE) (SCUSSEL, 2000). A seqüência analítica básica para a maioria dos métodos químicos usados em análise de micotoxina é o preparo das amostras, extração, limpeza, detecção, quantificação e a confirmação (EIZENDEHER, 2005).

A CCD tem sido a técnica mais utilizada no Brasil, pois o método é simples, econômico e exige menor consumo de solventes, quando comparado com a CLAE. Além disso, muitas amostras podem ser analisadas simultaneamente. Possui a desvantagem de ser um método menos sensível que a CLAE (PRADO, 2000). A CLAE apresenta vantagens de não expor as micotoxinas à degradação pelo ar e luz, melhor reprodutibilidade, seletividade e elevada sensibilidade, no entanto possui um custo mais elevado (SCUSSEL, 2000).

Os materiais utilizados para a fase estacionária em CCD são análogos aos empregados na cromatografia em colunas e são escolhidos de acordo com o processo cromatográfico que se pretende executar (EIZENDEHER, 2005).

Dentre os métodos imunológicos um dos principais é o *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) aprovado pela AOAC para triagem de aflatoxinas (SCUSSEL, 2000). Os ensaios imunológicos são muito utilizados devido a sua sensibilidade, especificidade, rapidez, simplicidade e baixo custo quando comparados as técnicas de cromatografia. A desvantagem de análise por ELISA limita-se a determinados tipos de alimentos, em vista ao efeito de matrizes que resultam em interferência nas reações imunológicas. Isto é, interações inespecíficas de anticorpo a

componentes alimentares (proteínas, ácidos graxo), ou bloqueio estérico da ligação entre anticorpo e analito superestimariam a concentração da micotoxina, resultando em reação falso-positiva (HEFLE, 1995). A base destes métodos é a interação entre antígenos (micotoxinas) e anticorpos específicos, produzidos em um organismo animal (BERGERE, 1991) (Figura 11).

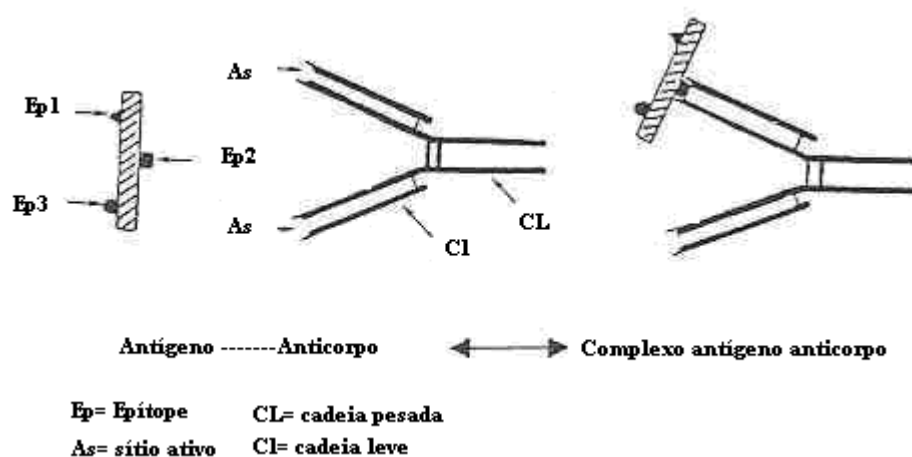


Figura 11 - Reação antígeno – anticorpo
 Fonte: Bergere, 1991.

A técnica ELISA é baseada na competição de ligação entre a toxina não marcada proveniente da amostra e a toxina marcada sobre os locais específicos do anticorpo (Figuras 11 e 12); a imunoafinidade é uma técnica cromatográfica baseada diretamente na ligação antígeno (toxina) com o anticorpo fixado numa coluna (FREMY; CHU, 1989).

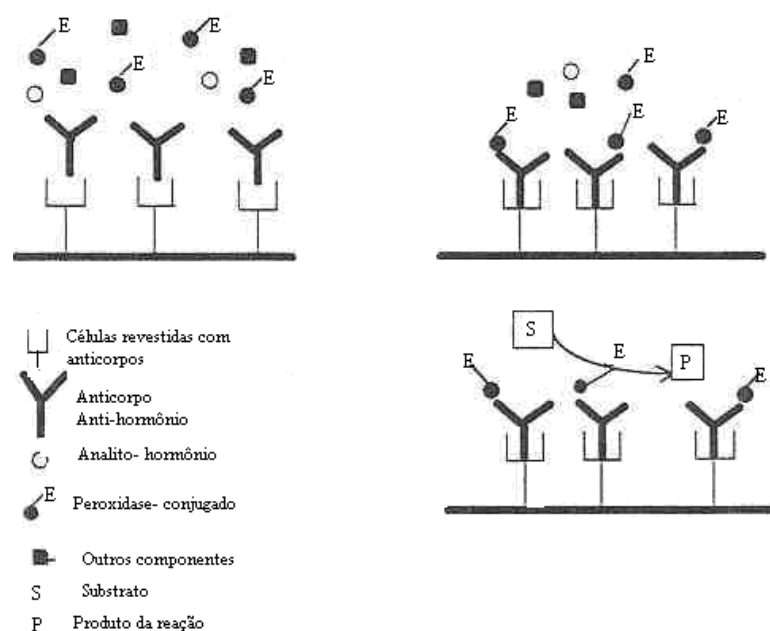


Figura 12 - Representação esquemática de um método imunoenzimático (ELISA)

Fonte: Amado (2007).

As enzimas mais utilizadas são a catalase, a glucose-oxidase, a-galactosidase, a fosfatase alcalina e a peroxidase (AMADO, 2007).

Um estudo realizado por vinte e quatro laboratórios europeus determinou aflatoxina B₁ (aproximadamente 15 µg/kg) em material de referência de ração. Dos vinte e quatro laboratórios, cinco utilizaram a cromatografia em camada delgada bi-dimensional com quantificação densitométrica e os outros a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. A porcentagem de recuperação, na maioria dos casos se situou entre 70 e 110% e os coeficientes de variação entre 16 e 19%. Foi concluído que diferentes métodos quando aplicados adequadamente, chegariam a resultados concordantes (RODRIGUEZ AMAYA, 2000).

Amaral et al. (2006) verificaram que do total de 123 amostras de alimentos à base de milho analisadas, sete mostraram-se positivas para aflatoxinas pelo método de CCD, e 16 pelo método imunoenzimático, sendo que das 123 amostras, 104 apresentaram resultados negativos pelos dois métodos.

No mesmo estudo, Amaral et al. (2006) concluíram que o método imunoenzimático apresentou 12 resultados falso-positivos e três resultados falso-negativos. Ao comparar o ELISA com a CCD, verificou que há diferença entre os dois métodos. Sendo assim, faz-se necessário, segundo os autores, a confirmação dos resultados obtidos com o teste imunoenzimático pelo método cromatográfico.

Oliveira; Prado e Junqueira (2000) analisaram 72 amostras de milho em grão quanto à presença de aflatoxinas através da cromatografia em camada delgada com quantificação visual e densitométrica e o teste imunoenzimático ELISA. Os autores concluíram que independente da técnica empregada frequências equivalentes são obtidas, dentro das mesmas faixas de teores de aflatoxinas total. Sendo assim não ocorreu nenhum resultado falso positivo ou falso negativo para o teste ELISA.

Abbas et al. (2006), analisando aflatoxinas e fumonisina pelos métodos de ELISA e CLAE, obtiveram uma correlação positiva para as duas aflatoxinas entre os dois métodos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e preparo das amostras de grãos de milho

Foram utilizadas vinte amostras de milho crioulo com origem nos estados do Paraná (dezesseis) e Rio Grande do Sul (quatro), cultivadas na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em Ponta Grossa, Paraná (Tabela 8).

A região apresenta clima classificado como tipo Cfb (clima temperado úmido com verão temperado), segundo classificação climática de Köppen-Geiger, temperatura média no mês mais frio abaixo de 18°C (mesotérmico), com verões frescos, temperatura média no mês mais quente abaixo de 22°C e sem estação seca definida. A precipitação anual é de 1400 mm, sendo as chuvas mais freqüentes no período de primavera-verão e mais escassas no outono-inverno (CARAMORI, 2003).

A semeadura foi realizada no dia 11/06/06 em Latossolo Vermelho Distrófico típico com textura argilosa e a colheita foi realizada em data próxima ao dia 15/03/2007. A adubação base da semeadura constou de 300 kg.ha⁻¹ da formulação 5-25-25 de NPK (nitrogênio-fósforo-potássio) e a adubação da cobertura foi realizada 45 dias após a emergência com uréia contendo 100 kg.ha⁻¹ de nitrogênio. Para o plantio foi realizado um delineamento experimental em quatro blocos distribuídos ao acaso, obtendo-se cerca de 2 kg de cada bloco, totalizando 8 kg por variedade.

As amostras para a caracterização fúngica e teste de força de ruptura foram armazenadas em ambiente com temperatura controlada de 22 ± 2°C e umidade relativa do ar de aproximadamente 70%, para posterior análise, a análise de contaminação fúngica foi realizada cerca de 5 dias após a colheita. As amostras utilizadas para as demais análises passaram por um processo de secagem em estufa a 80°C até atingirem uma umidade de cerca de 10% e armazenadas em recipientes herméticos.

Tabela 7. Identificação das 20 amostras utilizadas no estudo.

Variedade crioula	Local de origem	Variedade crioula	Local de origem
V1	Rio Azul - PR	V11	Rio Azul – PR
V2	Ponta Grossa-PR	V12	Rio Azul – PR
V3	Rio Azul – PR	V13	Rio Azul – PR
V4	Prudentópolis-PR	V14	Rio Azul – PR
V5	Rio Azul – PR	V15	Rio Azul – PR
V6	Rio Azul – PR	V16	Rio Azul – PR
V7	Rio Azul – PR	V17	Rio Azul – PR
V8	Pelotas – RS	V18	Fepagro – RS
V9	Rio Azul – PR	V19	Fapagro - RS
V10	Rio Azul – PR	V20	Pelotas - RS

4.2 Produção da farinha de milho *biju*

Com o objetivo de verificar a distribuição das micotoxinas nos subprodutos e na farinha de milho *biju*, foi realizada a produção da farinha de milho *biju* utilizando a metodologia proposta por Alessi, Raupp e Gardingo (2003), com adaptações, substituindo-se o processo de secagem em rolos por secagem em estufa a 50°C. A amostragem foi constituída pelos 4 blocos em estudo, sendo 62,5g de cada bloco, constituindo uma amostragem total de 250g.

Somente foram processadas as variedades de milho crioulas com maior contaminação por micotoxinas, verificadas através da análise de CCD e ELISA, objetivando-se detectar as micotoxinas nos diferentes subprodutos do processamento da farinha de milho *biju*.

As variedades utilizadas na preparação da farinha *biju* foram a 4, 7 e 12.

O processo de fabricação da farinha de milho *biju* consistiu na maceração em água por 10 horas a 50°C de duzentos e cinquenta gramas de cada variedade. Após este período, o gérmen (1º subproduto) e o pericarpo (2º subproduto) foram separados manualmente do endosperma que após a separação, passou pelo processo de moagem, para obter uma “massa” lisa, homogênea e úmida. Após esta etapa a “massa” foi colocada em um recipiente metálico e levada à estufa a temperatura de 80°C por 1 hora para a secagem completa e formação dos *bijus*.

A caracterização físico-química da farinha de milho *biju* e dos subprodutos foi realizada utilizando-se as análises de umidade, proteína bruta, extrato etéreo e cinzas.

A análise da presença de aflatoxinas totais e zearalenona na farinha de milho *biju* e nos subprodutos foram realizadas utilizando-se a técnica ELISA (Aflatoxinas, Romer AgraQuant e Zearalenona, Beacon Analytical Systems Inc).

4.3 Caracterização física e química

As amostras foram moídas em moinho de rotor da marca Tecnal, modelo Tecmill TE – 633, até uma granulometria média de 35 *mesh*, verificada pela utilização de peneiras.

4.3.1 Caracterização química

Os parâmetros empregados na caracterização das amostras foram umidade, proteína bruta, extrato etéreo, fibra alimentar total (método realizado com modificações, substituindo-se as enzimas produzidas pela Sigma Co pelas enzimas produzidas pela Novozymes Latin American Limited, utilizando as enzimas α -amilase (Termamyl), protease (Flavourzyme) e amiloglicosidase (AMG), fibra bruta, resíduo mineral e carboidratos disponíveis, conforme apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros utilizados na análise química das amostras de grãos e farinha de milho

Parâmetro	Metodologia	Referência
Umidade	Estufa a 105°C	AOAC (925.10), 2000
Proteína bruta	Micro Kjeldhal	AOAC (920.87), 2000
Lipídeos	Soxhlet	IAL, 2005
Cinzas	Muflo a 550°C	AOAC (923.03), 2000
Fibra alimentar	Enzimico-gravimétrico	AOAC (985.29), 2000
Fibra Bruta	Ácido-alcalino	IAL, 2005
Carboidratos Disponíveis	Diferença entre os demais constituintes	IAL, 2005

4.3.2 Caracterização física

4.3.2.1 Densidade aparente utilizando picnômetro e xileno.

A análise foi realizada utilizando-se a metodologia de complementação de volume proposta por Correa et al. (2002). A amostragem constituiu-se em ¼ de cada bloco em estudo, em duplicata.

O líquido utilizado como complementador de volume foi o xileno. Para a obtenção da densidade do líquido complementar o picnômetro foi pesado com a respectiva tampa em uma balança analítica. A seguir o picnômetro foi preenchido com

xileno, tampado e pesado e a densidade do líquido foi obtida pela relação entre a massa do líquido e o volume do picnômetro.

Para a determinação da densidade dos grãos, os grãos de milho foram colocados dentro do picnômetro até o seu limite, obtendo-se as massas dos grãos e do picnômetro separadamente. Após a determinação da massa do conjunto, completou-se o picnômetro com xileno até o seu limite delimitado pela tampa e uma nova pesagem foi realizada. Tendo conhecimento da massa do xileno e de sua densidade, calculou-se o volume ocupado pelos grãos. A densidade dos grãos foi determinada pela relação entre a massa e o volume dos grãos e do xileno.

4.3.2.2 Densidade aparente utilizando balança hidrostática

A análise foi realizada utilizando-se a metodologia da balança hidrostática proposta por Thompson e Goodman (2006).

Para a realização da análise foi utilizada de 20 a 30 g de amostra. As amostras foram pesadas primeiramente no ar, sem água, e posteriormente na água. Para o cálculo da densidade foi utilizada a Equação (1).

$$\text{Densidade (g/cm}^3\text{)} = \frac{\text{Peso no ar}}{(\text{Peso no ar} - \text{Peso na água})} \quad \text{Equação (1)}$$

4.3.2.3 Índice de flotação (IF)

O índice de flotação que estima de modo indireto a densidade e a dureza do endosperma do grão, foi realizado conforme a metodologia proposta por Lozano-Alejo et al. (2007) em duplicata. Utilizou-se uma solução de NaNO_3 ajustada a uma densidade de $1,25 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mediante o uso de um picnômetro.

A análise foi realizada com 600 mL da solução de NaNO_3 a 23°C onde cem grãos limpos e sãos foram colocados e levemente agitados. Após 1 minuto contou-se os grãos flutuantes.

A escala utilizada para classificação do milho quanto ao seu IF foi a citada por Salinas, Martinez e Gómez (1992), onde em valores de IF de 0-12% o milho é considerado muito duro, de 13 a 37% duro, de 38 a 62% intermediário, de 63 a 87% suave e acima de 87% muito suave.

4.3.2.4 Diâmetro Geométrico Médio (DGM) das partículas após a moagem

O DGM das partículas moídas de grão de milho foi determinado seguindo a metodologia de Zanotto e Bellaver, (1996), com adaptações, utilizando o moinho de rotor da marca Tecnal, modelo Tecmill TE – 633.

Para a realização desta análise foi utilizado um equipamento vibrador de peneiras marca Bertel e conjunto de peneiras números 16, 20, 30, 45, 60, 120 e fundo, correspondendo às seguintes aberturas de malhas: 1180, 850, 600, 355, 250 e 125µm.

Foram obtidas 300 gramas de amostra de cada variedade de milho após a moagem. As amostras passaram por um processo de secagem em estufa a 105°C por um período de 24 horas.

Após a pesagem das peneiras individualmente, as mesmas foram colocadas no equipamento vibrador de peneiras e sobrepostas em ordem crescente de abertura das malhas. As amostras foram pesadas e transferidas para o topo do conjunto de peneiras. As peneiras vibraram durante um período de 8 minutos, após este período foram pesadas, obtendo-se a fração de amostra retida em cada peneira (Equação 2). A percentagem de amostra retida em cada peneira foi calculada através da Equação 3.

$$PR_i = (P_{i2} - P_{i1}) \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde:

PR_i = peso retido na peneira i ;

P_{i2} = peso da peneira i mais a fração retida na mesma;

P_{i1} = peso da peneira i ;

$$\%R = (PR_i \times 100)/P \quad \textbf{(Equação 3)}$$

Onde:

%R = percentagem retida em cada peneira;

P = peso da amostra

O índice de uniformidade (IU), que indica a proporção entre partículas grossas (maior que 2 mm), médias (entre 2 e 0,6 mm) e finas (menor que 0,6 mm) foi calculado somando-se a %R das peneiras grossas, das médias e das finas, separadamente.

O diâmetro geométrico médio das partículas foi calculado utilizando a Equação 4.

$$DGM(\mu m) = 104,14 \times 2^{MF} \quad \textbf{(Equação 4)}$$

Onde MF é o produto de %R por valores constantes que decrescem de seis a zero com o decréscimo da abertura das peneiras.

4.3.2.5 Peso de 1000 grãos

A verificação do peso de mil grãos foi realizada pesando-se 100 grãos em balança analítica com 4 casas decimais e multiplicando-se o valor obtido por dez, seguindo a metodologia proposta por Coskun; Yalçın e Özarlan (2006). Realizou-se a verificação em duplicata.

4.3.2.6 Dimensões dos grãos

Para a verificação das dimensões dos grãos utilizou-se a metodologia proposta por Coskun; Yalçın e Özarlan, (2006), onde 100 grãos de cada variedade foram selecionados aleatoriamente. Destes, foram selecionados também aleatoriamente 10 grãos. Analisou-se a largura, L (mm), a espessura, E (mm) e o comprimento, C (mm), dos grãos selecionados. As medições foram realizadas utilizando um paquímetro com precisão de 0,05 mm.

A partir destas medidas pôde-se calcular o diâmetro médio, D_m (mm) das vinte variedades de milho crioulo (Equação 5).

$$D_m = (L * E * C)^{1/3} \quad \text{(Equação 5)}$$

4.3.2.6 Força de Ruptura

Os ensaios de força de ruptura foram realizados no laboratório de Ensaaios Mecânicos do curso de Engenharia de Materiais (UEPG), seguindo a metodologia proposta por Sandhu; Singh e Malhi (2007), com modificações. Para tal, foi utilizado o equipamento da marca Shimadzu modelo AG I, com célula de carga com capacidade máxima de 10 kN. Durante os ensaios, simultaneamente, é registrada a força aplicada (N) e a deformação (mm) sofrida durante a compressão até a ruptura do grão utilizando o programa *Trapezium*.

Utilizaram-se amostras previamente acondicionadas a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de aproximadamente 70%.

Para a realização dos ensaios com grãos de milho crioulo de cada variedade foram selecionados aleatoriamente, sendo que desta parcela foram selecionados também aleatoriamente dez grãos, dispostos horizontalmente e com o gérmen voltado para a célula de força (Figura 13).

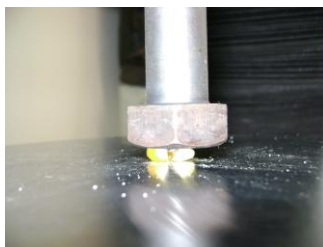


Figura 13 - Detalhe da célula de força durante a compressão do grão.

4.4 Caracterização Fúngica

A metodologia utilizada para a caracterização fúngica foi a do *Blotter test* proposta pelo *International Seed Testing Association* (1981). As amostras de grãos (400 grãos por variedade) foram incubadas por sete dias a uma temperatura de 22 ± 2 °C e submetidas a um fotoperíodo de 12h luz / 12h escuro.

Posteriormente os grãos de cada variedade foram analisados individualmente por colaboradores do curso de Agronomia da UEPG sob microscópio esterioscópico e, quando necessário, sob microscópio óptico. Amostras de cada gênero de fungo foram isoladas em placas de *Petri* contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) e incubadas em câmara B.O.D a uma temperatura aproximada de 22 °C para o crescimento fúngico.

4.5 Análises de detecção de micotoxinas

As micotoxinas analisadas foram Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e Zearalenona, utilizando o método imunológico (ELISA) e o método de cromatografia em camada delgada (CCD).

4.5.1 Aflatoxinas totais (ELISA)

A análise de aflatoxinas totais pelo método ELISA foi realizada com o *Kit* de ELISA da Romer AgraQuant, Aflatoxinas Totais 1/20, com a metodologia disponibilizada pela Romer Labs (2004).

a) Materiais e reagentes

- Noventa e seis poços recobertos com anticorpos (doze tiras com oito poços cada), em um suporte para poços (armazenados em embalagem laminada);
- Noventa e seis poços de diluição não recobertos com anticorpos (doze tiras com oito poços cada);
- Seis frascos de padrões de aflatoxina contendo 1,5 mL, correspondentes a 0,0; 1,0; 2,5; 4,0; 10,0 e 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (ppb) de aflatoxina;

- Um frasco contendo vinte e cinco mL de conjugado aflatoxina – enzima (HRP – Horse Radish Peroxidase – Peroxidase de Rábano);
- Um frasco contendo quinze mL de solução substrato;
- Um frasco contendo quinze mL de solução “STOP” (Ácido clorídrico 1N);
- Planilha eletrônica no software Excel, para obtenção dos resultados em ppb.

b) Extração e Limpeza das amostras

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

Os extratos foram armazenados sob refrigeração por, no máximo, 12 horas.

c) Imunoensaio

Foram transferidos 200 μ L do conjugado de aflatoxina-enzima (HRP) em temperatura ambiente, para cada um dos poços da placa de diluição do *Kit*, seguidos pela adição de 100 μ L dos padrões ou dos extratos das amostras.

Utilizando uma pipeta multicanal de 8 vias fez-se uma homogeneização do conteúdo dos poços de diluição, transferindo imediatamente 100 μ L do conteúdo de cada poço de diluição a um poço recoberto com anticorpos, incubando em temperatura ambiente por 15 minutos.

Passado o período de reação, o conteúdo dos poços foi descartado e os mesmos 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 de substrato foi adicionado aos poços e estes foram incubados durante 5 minutos, após este período uma solução de HCL 1N foi adicionada com o objetivo de interromper a reação, as intensidades de cor de cada poço foram lidas em uma leitora de microplacas Bio Tek, modelo ELX 800 com um filtro de 450 nm. Os valores de absorbância das amostras desconhecidas são comparados com os valores dos padrões, para obter-se a concentração de aflatoxinas. Os valores de absorbância são lançados em uma planilha eletrônica e os resultados expressos em ppb.

4.5.2 Zearalenona (ELISA)

A determinação de zearalenona pelo método ELISA foi feita com o *Kit* da Beacon Analytical Systems Inc, utilizando a metodologia disponibilizada pela Beacon Analytical Systems Inc (2006).

a) Materiais e reagentes

- Noventa e seis poços recobertos com anticorpos (doze tiras com oito poços cada), em um suporte para poços (armazenados em embalagem laminada);
- Noventa e seis poços de diluição não recobertos com anticorpos (doze tiras com oito poços cada);
- Cinco frascos de padrões de zearalenona contendo dois mL, correspondentes a 0,0; 20; 50; 250 e 1000 µg/L (ppb) de zearalenona. Os padrões 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;
- Um frasco contendo doze mL de conjugado aflatoxina – enzima (HRP – *Horse Radish Peroxidase* – Peroxidase de Rábano);
- Um frasco contendo doze mL de solução substrato;

- Um frasco contendo doze mL de solução “STOP” (Ácido clorídrico 1N);
- Planilha eletrônica no software Excel, para obtenção dos resultados em ppb.

b) Extração e limpeza das amostras

O extrato para a determinação de zearalenona foi obtido de 50 gramas da amostra triturada e homogeneizada em uma mistura de metanol e água na proporção 80:20 (v/v). O material foi homogeneizado em *blender* 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, os extratos foram diluídos cinco vezes em uma solução de metanol 80%, se constituindo no extrato para o imunoensaio.

Os extratos foram armazenados sob refrigeração, por no máximo 12 horas.

c) Imunoensaio

Foram transferidos 100µL das amostras e padrões para cada um dos poços da placa de diluição do *Kit*, seguidos pela adição de 200µL da enzima conjugada.

Utilizando uma pipeta multicanal de 8 vias fez-se uma homogeneização do conteúdo dos poços de diluição, transferindo imediatamente 100µL do conteúdo de cada poço de diluição a um poço recoberto com anticorpos, incubando em temperatura ambiente por 10 minutos.

Passado o período de reação, o conteúdo dos poços foi descartado e os mesmos 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 de substrato foi adicionado aos poços e estes foram incubados durante 5 minutos, após este período uma solução de HCL 1N foi adicionada com o objetivo de interromper a reação, as intensidades de cor de cada poço foram lidas em uma leitora de microplacas Bio Tek, modelo ELX 800 com um filtro de

450 nm. Os valores de absorvância das amostras desconhecidas são comparados com os valores dos padrões, para obter-se a concentração de zearalenona. Os valores de absorvância são lançados em uma planilha eletrônica e os resultados expressos em ppb.

4.5.3 Aflatoxinas e Zearalenona (CCD)

A determinação de aflatoxinas e zearalenona por CCD foi realizada segundo a metodologia proposta por Soares e Rodriguez-Amaya, (1989), com limites de detecção do método para aflatoxinas de 2 ppb e para zearalenona de 55 ppb.

a) Padrões analíticos

Foram utilizados padrões de micotoxinas da marca Sigma Chemical Co. (EUA) e a preparação das soluções padrões foi realizada de acordo com o Manual de Métodos Oficiais de Análises da AOAC (2000) por técnicos de laboratório treinados.

b) Preparo das amostras

As amostras foram moídas em um moinho de rotor da marca Tecnal, modelo Tecmill TE – 633 até uma granulometria de 20 *mesh*.

c) Extração e Limpeza

Cinquenta gramas da amostra foram homogeneizadas em *blender* com 270 mL de metanol e 30 mL de cloreto de potássio 4% durante 5 minutos. A mistura foi filtrada em papel filtro comum. Cento e cinquenta mL do filtrado foram transferidos para um béquer onde foram adicionados 150 mL de sulfato de amônio 30% e 50 mL de celite, e deixado em repouso durante 5 minutos, durante esta etapa ocorreu uma clarificação da amostra pela ação do sulfato de amônio e do celite (SOARES; RODRIGUEZ-AMAYA, 1989). A mistura foi filtrada em papel filtro comum. Cento e cinquenta mL do filtrado foram transferidos para um funil de separação e adicionados de 150 mL de água.

d) Quantificação por cromatografia em camada delgada

A mistura obtida anteriormente foi particionada duas vezes com 10 mL de clorofórmio. Cinco mL da primeira e da segunda partição de clorofórmio foram

combinados e evaporados em banho de água a 80°C. O resíduo obtido foi dissolvido em 200 µL de uma solução na proporção de 98:2 (v/v) de benzeno:acetonitrila.

Para triagem foram utilizados 5 µL do extrato obtido de cada amostra em uma cromoplaca (Sil G - silicagel 60G) a 2 cm da sua base base. Os padrões foram aplicados separadamente nas quantidades de 0,5, 1, 2, 3, 4 e 5 ml. A placa foi colocada em uma cuba não saturada contendo tolueno:acetato de etila:clorofórmio:ácido fórmico, 70:50:50:20 (v/v/v/v) para a absorção do solvente. A placa foi removida após o desenvolvimento da reação em aproximadamente 10 cm e visualizada sob luz ultravioleta de longo espectro, para a verificação da possível presença das micotoxinas. A presença de aflatoxinas é confirmada utilizando-se o ácido trifluoroacético de acordo com a metodologia proposta por Przybylski (1975). Os cálculos são realizados de acordo com o Manual de Métodos Oficiais de Análises da AOAC (2000).

Para a detecção de zearalenona nas amostras, utilizou-se a mesma cromoplaca utilizada anteriormente para a determinação de aflatoxinas, aspergindo sobre a superfície da cromoplaca uma solução de acetilato com anidrido acético em presença da piridina de acordo com a metodologia proposta por Golinski e Grabarkiewicz-Szczena, (1984).

A presença de zearalenona foi detectada sem a utilização de nenhum equipamento, comparando-se a intensidade da reação das diferentes amostras com os padrões nas cromoplasas a olho nu, logo após a aspersão.

4.6 Análises Estatísticas

Para se verificar a similaridade entre as amostras e a existência de correlação estatística entre as variáveis estudadas foram realizadas análises estatísticas utilizando os programas Origin-Pro 6.1, Statistica 8.0 e Pirouette 7.0. Os dados foram verificados através da análise de variância e teste de comparação de médias de *Tukey* e *Scott Knott*.

A similaridade entre as variedades em estudo foi verificada através da correlação *Pearson* e análise de componentes principais (PCA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises nos grãos de milho

5.1.1 Caracterização química

Os valores médios dos teores de umidade (%), proteína bruta (% em base seca), lipídeos (% em base seca), cinzas (% em base seca), fibra alimentar total (FAT) (% em base seca), fibra bruta (FB) (% em base seca) e carboidratos disponíveis (CD) (% em base seca) das 20 variedades de milho utilizadas neste estudo, distribuídas em um delineamento experimental de 4 blocos casualizados são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Média da composição química das variedades de milho crioulo analisadas.

Variedade	Umidade	Proteína	Lipídeos	Cinzas	FAT	FB	CD
V1	10,82*	9,28a	4,24a	1,26*	12,10c	2,10c	62,28a
V2	10,29*	9,34a	4,14a	1,32*	12,37c	2,21c	62,51a
V3	11,17*	8,24b	3,27b	1,34*	11,86c	1,50c	64,09c
V4	11,07*	8,54b	3,85a	1,37*	15,28a	2,99b	59,87d
V5	10,88*	8,71b	3,33b	1,38*	16,11a	3,26a	59,55d
V6	10,63*	8,83b	4,43a	1,31*	12,38c	2,26a	62,39a
V7	11,17*	8,41b	3,89a	1,31*	13,38b	1,69c	61,80a
V8	11,03*	8,82b	3,83a	1,33*	11,20c	1,84c	63,76a
V9	10,99*	9,31a	3,68b	1,27*	9,68d	1,79c	65,04b
V10	11,19*	8,67b	4,09a	1,29*	12,81c	2,17c	61,93a
V11	11,18*	8,49b	4,02a	1,34*	11,53c	1,84c	63,41a
V12	11,06*	9,29a	4,13a	1,38*	15,09a	2,65c	59,02a
V13	10,99*	9,16a	3,97a	1,23*	13,58b	3,56a	61,05a
V14	11,35*	8,95b	4,06a	1,35*	13,51b	1,71c	60,75 ^a
V15	11,44*	8,69b	3,64b	1,36*	12,06c	1,97c	62,78a
V16	10,67*	8,57b	3,30b	1,32*	12,58c	2,04c	63,54a
V17	10,82*	8,94b	3,77a	1,39*	12,37c	1,64c	62,69a
V18	10,73*	9,96a	4,02a	1,35*	8,83d	1,70c	65,08b
V19	11,13*	8,68b	3,59b	1,30*	10,39d	2,69b	64,88b
V20	11,38*	8,17b	3,54b	1,29*	10,18d	2,61b	65,42b

As médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si através do teste de *Scott Knott* ao nível de 5% de probabilidade. * Diferença estatística não significativa.

FAT. Fibra Alimentar Total, FB. Fibra bruta, CD. Carboidratos Disponíveis.

Foi possível verificar que o teor de umidade das amostras variou entre 10,29%(V2) e 11,44%(V15). Através da análise de variância observamos que as variedades não diferem estatisticamente entre si quanto ao teor de umidade. Esta

homogeneidade no teor de umidade ocorreu devido a secagem pós-colheita a 80°C, comumente utilizada com o objetivo de limitar o desenvolvimento fúngico e a deterioração durante o período de armazenamento, esta necessidade advém do fato da maioria dos fungos toxigênicos se desenvolverem em um teor de umidade maior que 13% (BAPTISTA; HORI; BAPTISTA, 2004).

Os resultados de umidade são semelhantes aos encontrados por Callegaro et al. (2005), em amostras de milho em grão do tipo pipoca com umidade de 12%, mas inferiores aos relatados por Carvalho et al, (2004) com teores que variaram entre 13,5 e 15%. Estes autores analisaram amostras após o período de armazenamento e pré-secagem.

Na Instrução de Serviço SNA nº 1, de 21 de março de 1991, o limite máximo de umidade no grão integral moído para a utilização em rações não deve ultrapassar 12,5%. A real quantidade de umidade em uma semente serve como critério para sua comercialização, além de influenciar na conservação determinando o estabelecimento de um ambiente típico, que pode ser favorável ou não ao desenvolvimento de patógenos, que só ocorre a partir de um teor mínimo de umidade (DALPASQUALE, 2002).

O teor de proteína bruta das amostras analisadas variou entre 8,17% (V20) e 9,96% (V18) (Tabela 9). Verificou-se que existe diferença significativa ($p < 0,05$) entre as variedades analisadas. Isto pode ser explicado pelo fato das amostras serem de diferentes variedades.

A média dos valores de proteína bruta ficou em 8,55%, acima dos valores encontrados por Mazzuco et al. (2002) de 7,7% em milho grão. Mas aproximam-se dos teores encontrados por Carvalho et al. (2004) de 8,52% em milho grão, por Marques (2007) em produtos derivados de milho de 8,32%, Veloso et al. (2005) de 8% e

Rostagno et al. (2005) de 8,3%. Em um trabalho realizado por Meneguetti; Girardi e Reginatto (2002) com milho crioulo proveniente do município de Anchieta (SC), os teores de proteína bruta em milho variaram entre 7,36% e 9,35%, muito próximos aos valores encontrados neste estudo.

Do ponto de vista tecnológico o milho pode ser classificado pelo teor de proteína bruta. Grãos com menor quantidade de proteína bruta poderão ser utilizados na produção de *gritz* (ZHANG; HOSENEY, 1998). Assim como na produção de “snacks”, o ideal é um teor protéico menor, garantindo assim, uma maior expansão do “snack”, pois a fração protéica zeína interfere negativamente na extrusão (FLETCHER et al., 1985). Já o milho com elevado teor protéico é muito utilizado na alimentação animal (PAES, 2006).

Quatro das vinte amostras analisadas (V3, V7, V11 e V20) estavam abaixo do limite mínimo de proteína bruta preconizado pelo Ministério da Agricultura (Instrução de Serviço SNA, nº 1, 21/03/1991) de 8,5% para o milho integral moído para a alimentação animal, sendo estas amostras consideradas, portanto de baixo valor protéico.

Os teores de lipídeos nas amostras analisadas variaram de 3,30% (V16) a 4,43% (V6) (Tabela 10). Através da análise de variância verificou-se que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as variedades estudadas, pode-se, portanto classificar as variedades quanto ao seu teor lipídico.

A maioria dos resultados variou entre 3 e 4%, sendo que a média geral de teores de lipídeos das amostras analisadas foi de 3,83%. Isto é importante quando trata da classificação dos grãos para a produção de óleos e outros alimentos, já que o óleo do milho possui quantidades significativas de tocoferóis, carotenóides e de ácidos graxos

essenciais que trazem benefícios para a saúde humana, prevenindo doenças cardiovasculares e combatendo o colesterol sérico elevado (PAES, 2006).

Já para a produção de *gritz*, por exemplo, quanto menor o teor de lipídeos maior será o rendimento durante o processo de degerminação (GONÇALVES et al., 2003). Quando aves são alimentadas com ração à base de milho com teores de lipídeos acima de 4% observa-se uma melhora na qualidade e rendimento na produção de ovos (HAN; YANG; ZHOU, 1987)

Os dados encontrados foram semelhantes aos encontrados por Caleggaro et al. (2005), Carvalho et al. (2004), Gonçalves et al. (2003) e Veloso et al. (2005), de 3,5%, 4,4%, 4,4%, e 4%, respectivamente. Câmara, (2005) encontrou valores de lipídeos semelhantes aos relatados neste estudo, 4,28% e 5,22% para as variedades crioulas Palha Roxa e Asteca, respectivamente.

Nenhuma amostra apresentou um teor de lipídeos acima dos limites mínimos estabelecidos pelo Ministério da Agricultura (Instrução de Serviço SNA, nº 1, 21/03/1991) para o preparo de ração animal utilizando milho integral moído, que é de 3%.

O teor de cinzas variou entre 1,26% (V1) e 1,38% (V12) (Tabela 10) e o teor médio de cinzas das amostras foi de 1,32%. Estatisticamente, não existe diferença significativa entre as variedades quanto ao teor de cinzas. Os valores de cinzas são concordantes com os valores encontrados por Gonçalves et al. (2003), de 1,27% para amostras de milho em grão, por Carvalho et al. (2004) de 1,25% e por Mazzuco et al. (2002), com valores entre 0,94 e 1,23%. Porém estão abaixo dos encontrados por Veloso et al. (2005), de cerca de 1,5%, e acima dos encontrados por Callegaro et al. (2005) em milho tipo pipoca, de cerca de 1,21%.

Nenhuma das amostras analisadas apresentou teor de cinzas acima do preconizado pelo Ministério da Agricultura (Intrusão de serviço SNA, nº 1, 21/03/1991) para a produção de ração para a alimentação animal que é de no máximo 2%.

Os teores de fibra alimentar total ficaram entre 8,83% (V18) e 16,11% (V5) (Tabela 10) sendo o teor médio 12,36%. Verificou-se ainda, que existe diferença estatística entre as variedades ($p < 0,05$) quanto ao teor de fibra alimentar total, percebendo-se ainda que algumas variedades possuem altos teores de fibra alimentar total ao contrário de outras que possuem baixos valores deste componente. Os resultados encontrados neste estudo são semelhantes aos relatados por Callegaro et al. (2005) e abaixo dos encontrados por Silva; Ciocca e Furlong (2008), de 12,57% e 13,30%, respectivamente.

No Brasil, a Portaria 27 de 1998 da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, estabelece, no regulamento técnico, que um alimento pode ser considerado fonte de fibra alimentar total quando apresentar no produto pronto 3g/100g (base integral) para alimentos sólidos e 1,5g/100mL (base integral) para líquidos; já com o dobro deste conteúdo é considerado um alimento com elevado teor de fibra alimentar total.

Os valores de fibra bruta variaram entre 1,5% (V3) e 3,56% (V13) (Tabela 10), sendo que a média dos valores obtidos foi de 2,21%. Verificou-se ainda, que existe diferença significativa ($p < 0,05$) entre as variedades estudadas quanto ao teor de fibra bruta. Os resultados encontrados estão acima dos relatados por Veloso et al. (2005), de 1,88%, mas são semelhantes aos encontrados por Carvalho et al. (2004), de 2,21% e Mazzuco et al. (2002), que encontraram valores de fibra bruta que variaram entre 1,96% e 3,23% para milho em grão.

O conhecimento da concentração de fibra bruta dos constituintes da ração é importante, pois esse componente influencia diretamente no desempenho dos animais.

Segundo Leonel (2008) a determinação de fibra bruta é muito utilizada na determinação de fibras na alimentação de não ruminantes, uma vez que é uma metodologia fácil. Já em alimentos destinados a alimentação de ruminantes, esta análise deve ser evitada, pois deixa de quantificar a lignina e a celulose do alimento.

Os valores de carboidratos disponíveis variaram entre 59,02% (V12) e 65,42% (V20) (Tabela 10) com um teor médio de carboidratos disponíveis para as variedades analisadas de 62,59%. Apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) entre as variedades em estudo.

Os resultados encontrados assemelham-se aos dados relatados por Callegaro et al. (2005), que verificaram um teor médio de carboidratos disponíveis nas amostras de milho do tipo pipoca de 61,3% e Pinho et al. (2003), que relataram valores de carboidratos disponíveis que variaram entre 41,2% e 72,3% em diferentes cultivares de milho. No entanto foram inferiores aos encontrados por Marques (2007), de 66,79% a 76,96% em quirera de milho e Gonçalves et al. (2003), de cerca de 70% em milho em grão, já que os mesmos realizaram análise de carboidratos totais.

Uma das vantagens do milho possuir um maior teor de carboidratos disponíveis é um maior índice de expansão do milho na produção de “snacks”, melhorando assim o rendimento (ZHANG; HOSENEY, 1998). Outra vantagem é o maior rendimento na degerminação e tamização na produção de *gritz* de milho (GONÇALVES et al., 2003).

Como exposto na Tabela 10 as variedades de milho analisadas apresentaram um alto valor de carboidratos disponíveis e lipídeos, sendo, portanto, classificado como um alimento altamente energético para a alimentação de animais e seres humanos. As médias dos teores de umidade, proteína bruta, lipídeos, cinzas, fibra alimentar total, fibra bruta e carboidratos disponíveis estão disponibilizados na Figura 14.

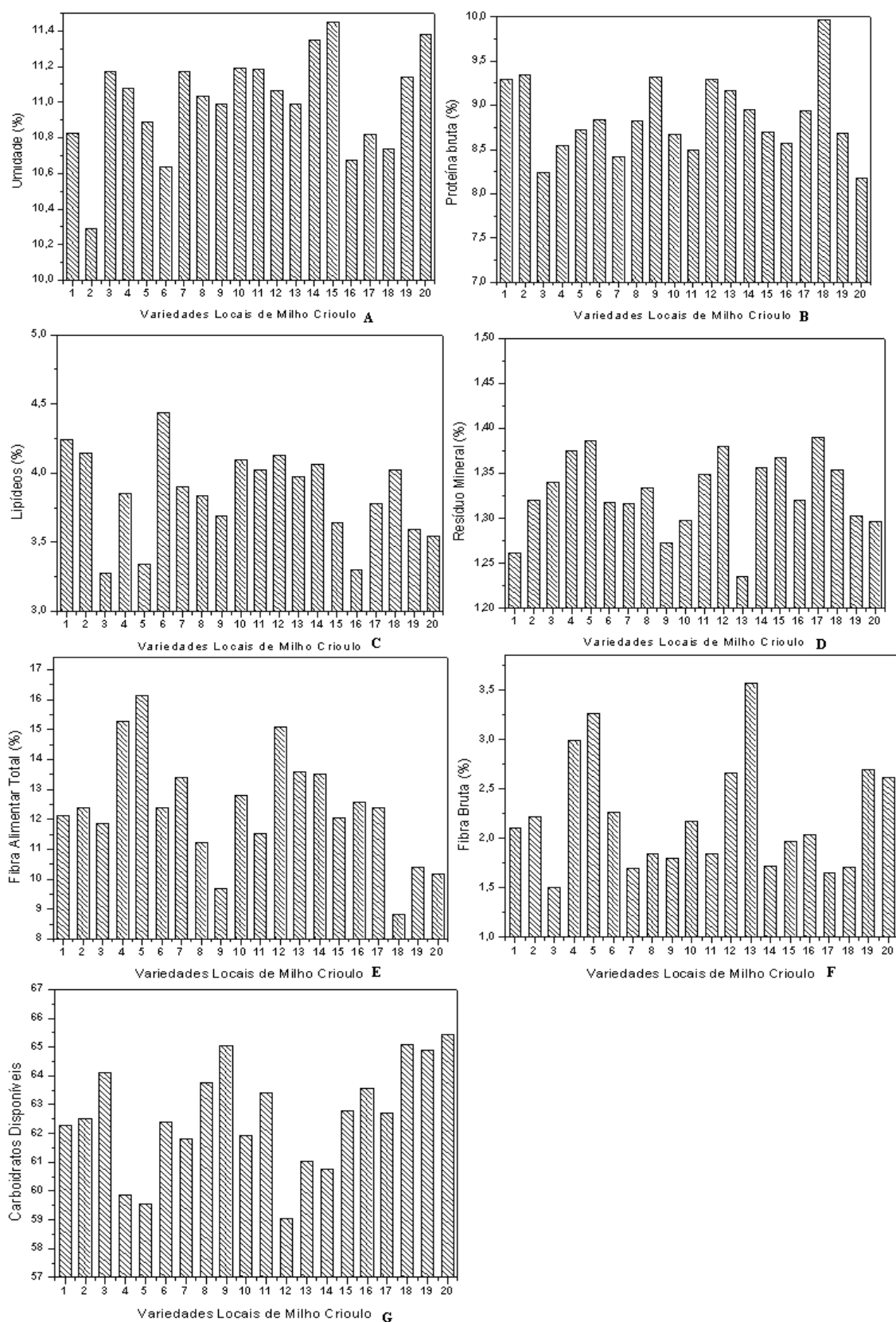


Figura 14. Teores médios de Umidade (a), Proteína Bruta (b), Lipídeos (c), Cinzas (d), Fibra Alimentar Total (e), Fibra Bruta (f) e Carboidratos Disponíveis (g) nas amostras analisadas.

5.1.2 Densidade

São apresentados na Tabela 10 os resultados de densidade para as 20 variedades, utilizando os métodos do picnômetro e da balança hidrostática.

Tabela 10. Densidade (g/cm^3) das variedades analisadas, por duas metodologias

Variedade	Picnômetro	Balança hidrostática
V1	1,27±0,002 c _a	1,21±0,05 a _a
V2	1,27±0,005 c _a	1,23±0,01 a _a
V3	1,27±0,005 d _a	1,21±0,05 a _a
V4	1,25±0,09 d _a	1,22±0,01 a _a
V5	1,24±0,002 e _a	1,17±0,06 a _b
V6	1,29±0,006 b _a	1,25±0,05 a _a
V7	1,29±0,001 b _a	1,23±0,03 a _a
V8	1,27±0,005 c _a	1,23±0,02 a _a
V9	1,26±0,04 d _a	1,24±0,02 a _a
V10	1,31±0,01 a _a	1,27±0,02 a _a
V11	1,26±0,01 d _a	1,25±0,01 a _a
V12	1,26±0,09 d _a	1,25±0,06 a _a
V13	1,27±0,003 c _a	1,26±0,03 a _b
V14	1,26±0,05 d _a	1,22±0,04 a _a
V15	1,22±0,015 e _a	1,21±0,04 a _a
V16	1,25±0,008 d _a	1,22±0,07 a _a
V17	1,26±0,001 d _a	1,23±0,03 a _b
V18	1,29±0,01 b _a	1,32±0,1 a _a
V19	1,23±0,001 e _a	1,20±0,05 a _a
V20	1,26±0,007 d _a	1,23±0,03 a _a

As médias seguidas pela mesma letra na coluna e na mesma linha não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si através do teste de Tukey.

As amostras diferem estatisticamente entre si quando analisadas pelo picnômetro ($p < 0,05$). A densidade obtida através da técnica que utilizou picnômetro variou entre $1,22 \text{ g/cm}^3$ (V15) e $1,31 \text{ g/cm}^3$ (V10) e utilizando a técnica com a balança hidrostática a densidade dos grãos ficou entre $1,17 \text{ g/cm}^3$ (V5) e $1,27 \text{ g/cm}^3$ (V10). Os valores obtidos pelas duas técnicas foram semelhantes aos citados na literatura para milho em grão (LEFORD; RUSSEL, 1985, CAVANAUGH et al., 1995, CORREA et al., 2002, TEIXEIRA, et al., 2003, THOMPSON; GOODMAN, 2006).

Quando os métodos são comparados estatisticamente através da análise de variância, percebe-se que os resultados obtidos são semelhantes (Tabela 10), verificando-se que somente em 15% (3 amostras) foram obtidos resultados discordantes de densidade pelos dois métodos utilizados. É importante salientar, que a técnica que utiliza a balança hidrostática possui um custo significativamente inferior do que a que utiliza o picnômetro, e é mais simples de ser aplicada.

Os resultados obtidos pelos métodos utilizados se correlacionam significativamente. A correlação de Pearson obtida entre os métodos utilizados foi de $r=0,49$ ($p<0,05$), sendo portanto uma correlação significativa.

5.1.3 Índice de flotação

Pode-se verificar que existe diferença estatística entre as variedades analisadas quanto ao índice de flotação ($p<0,05$) (Tabela 11).

Tabela 11. Índice de flotação e textura das variedades analisadas.

Variedades	Índice de flotação (%)	Textura
V1	38 e	Intermediário
V2	43 c	Intermediário
V3	38 e	Intermediário
V4	37 e	Duro
V5	53 a	Intermediário
V6	32 f	Duro
V7	39 d	Intermediário
V8	40 d	Intermediário
V9	29 g	Duro
V10	19 i	Duro
V11	32 f	Duro
V12	32 f	Duro
V13	30 g	Duro
V14	32 f	Duro
V15	47 b	Intermediário
V16	25 h	Duro
V17	29 g	Duro
V18	40 d	Intermediário
V19	43 c	Intermediário
V20	44 c	Intermediário

Amostras seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey..

O índice de flotação, que prediz a proporção de endosperma duro, intermediário e macio, ficou entre 19% e 53% (Tabela 12), este resultado está abaixo dos relatados por Peplinski et al. (1989) em milho híbrido nos Estados Unidos, e acima dos apresentados por Duarte et al., (2007), para milho híbrido na condição safrinha no Brasil. Resultados semelhantes foram apresentados por Lozano-Alejo et al. (2007), que analisaram amostras de milho crioulo e híbrido, verificando que as variedades crioulas apresentaram uma média de índice de flotação de 34%. Segundo a classificação apresentada por Salinas; Martinez e Gómez (1992), 60% do milho analisado pode ser enquadrado no grupo que possui endosperma de textura dura e 40% com endosperma de textura intermediária.

5.1.4 Diâmetro geométrico médio das partículas moídas (DGM)

O diâmetro geométrico médio das partículas variou entre 849,5 μ m (V10) e 1142 μ m (V12) (Tabela 12).

Tabela 12 - Diâmetro Geométrico médio das partículas das variedades analisadas.

Variedades	Diâmetro geométrico médio (μ m)
V1	1018,4 $\pm$ 84
V2	1047,0 $\pm$ 90
V3	1095,6 $\pm$ 55
V4	1103,7 $\pm$ 49
V5	1049,8 $\pm$ 4,9
V6	1023,7 $\pm$ 15
V7	1122,2 $\pm$ 42
V8	952,6 $\pm$ 12
V9	1047,5 $\pm$ 41
V10	849,5 $\pm$ 305
V11	1085,6 $\pm$ 57
V12	1142,6 $\pm$ 51
V13	878,7 $\pm$ 44
V14	942,7 $\pm$ 32
V15	1023,8 $\pm$ 22
V16	1062,3 $\pm$ 35
V17	1113,6 $\pm$ 72
V18	950,8 $\pm$ 7,4
V19	1102,9 $\pm$ 16
V20	1014,4 $\pm$ 14

Através da análise de variância foi possível verificar que não houve diferença estatística significativa entre as variedades quanto ao diâmetro geométrico médio das partículas após a moagem. Os resultados obtidos neste estudo foram superiores aos relatados por Pozza et al. (2005), em milho híbrido, que encontraram uma faixa de diâmetro geométrico médio entre 464 μm e 912 μm , não sendo comparável aos dados relatados no presente estudo, pois trata-se de moinhos diferentes.

Segundo Nir et al. (1990), o diâmetro geométrico médio das partículas de milho presentes na ração animal pode influenciar o seu consumo pelas aves. As maiores partículas são preferidas, em detrimento das menores e finamente moídas.

Em um estudo realizado por Dahlke et al. (2001), foi verificada uma tendência a um aumento do rendimento da carcaça de frangos de corte, com o aumento do diâmetro geométrico médio a partir de 500 μm .

Sendo assim, o maior diâmetro geométrico médio das variedades em estudo poderia ser explorado como uma vantagem na utilização destas na alimentação animal.

5.1.5 Peso de 1000 grãos

O peso de 1000 grãos teve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as variedades analisadas. Tendo uma amplitude de 259,5 g a 398,8g como pode ser verificado na Tabela 13.

Tabela 13 - Peso de 1000 grãos (P1000) das variedades analisadas.

Variedades	Peso de 1000 grãos (g)
V1	286,5±0,9 c
V2	353,6±0,3 b
V3	291,7±31 c
V4	273,6±11 c
V5	317,4±8 c
V6	294,0±14 c
V7	301,7±9 c
V8	307,8±19 c
V9	294,2±6 c
V10	259,5±2 c
V11	334,3±4 b
V12	288,1±12 c
V13	280,4±2 c
V14	338,0±11 b
V15	346,4±13 b
V16	324,1±2 b
V17	301,1±6 c
V18	398,8±24 a
V19	297,8±17 c
V20	291,0±37 a

Amostras seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de *Scott Knott*.

Os resultados encontrados estão acima dos encontrados por Sandhu; Singh e Malhi (2007) que obtiveram valores entre 102 g e 310 g para as variedades em estudo e por Mestres; Matencio e Louis-Alexandre (1995), que obtiveram como resultados a faixa de 193 a 315g, para milho híbrido. E são semelhantes aos apresentados por Peplinski et al. (1989), de 270g a 390g para milho híbrido e Salinas; Arellano e Martinez (1992), que encontraram uma variação de cerca de 230g a 330g para milho híbrido. Quanto maior o peso de 1000 grãos, maior é o tamanho médio dos grãos de cada variedade, isto implica em um maior rendimento final de cada variedade.

5.1.6 Análise das dimensões dos grãos

Na Tabela 14, tem-se as dimensões dos grãos das variedades em estudo, quanto a largura (L), comprimento (C), espessura (E) e diâmetro (D).

Tabela 14. Dimensões dos grãos das variedades em estudo

Variedades	L (mm)	C (mm)	E (mm)	D (mm)
V1	9,2±1,3 c	13,2±2,4 a	4,2±0,7 a	8,0±1,1 a
V2	9,7±0,8 b	11,5±0,7 b	4,7±1,2 a	8,0±0,6 a
V3	8,4±1,5 c	11,1±1,5 b	4,9±2,0 a	7,5±0,3 b
V4	8,7±1,8 c	10,4±1,9 c	5,0±1,6 a	7,5±0,5 b
V5	10,4±0,9 a	12,7±1,4 a	4,5±0,4 a	8,4±0,5 a
V6	8,7±0,6 c	11,9±1,1 a	4,1±0,4 a	7,5±0,5 b
V7	8,6±0,7 c	11,4±0,7 b	4,0±0,4 a	7,3±0,2 b
V8	8,7±0,8 c	10,6±1,4 c	5,0±1,0 a	7,7±0,3 b
V9	7,7±2,4 c	12,5±2,0 a	3,9±0,5 a	7,0±1,3 b
V10	8,1±0,9 c	9,5±1,2 c	5,0±1,5 a	7,1±0,4 b
V11	9,1±1,3 c	12,4±1,5 a	4,8±1,1 a	8,1±0,5 a
V12	8,8±0,7 c	12,8±1,3 a	4,1±0,8 a	7,7±0,3 b
V13	8,1±1,0 c	12,3±1,0 a	4,6±0,8 a	7,7±0,4 b
V14	9,9±0,9 b	12,3±1,3 a	3,9±0,4 a	7,8±0,6 a
V15	9,5±1,2 b	12,4±1,5 a	4,6±0,9 a	8,1±0,7 a
V16	9,6±0,5 b	12,7±0,9 a	4,3±1,1 a	8,0±0,4 a
V17	9,2±0,9 c	12,1±0,8 a	4,4±0,4 a	7,9±0,4 a
V18	10,9±1,4 a	12,1±1,4 a	4,3±0,5 a	8,2±0,6 a
V19	8,2±1,1 c	13,9±1,8 a	4,0±1,2 a	7,6±0,5 b
V20	9,0±0,6 c	12,5±1,2 a	4,3±1,1a	7,8±0,4 a

Amostras seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de *Scott Knott*.

A espessura das amostras analisadas variou entre 3,9 mm e 5,0 mm, sendo que os resultados das variedades não foram diferentes estatisticamente. Coskun; Yalçin e Özarıslan (2006) citam valores inferiores para a variável espessura, estando 83% dos dados obtidos entre 2,5 mm e 4,0 mm em um percentual de umidade de 11,54%, em milho híbrido.

Resultados semelhantes foram relatados por Teixeira et al. (2003), onde foram analisadas duas variedades de milho, verificando que a espessura dos grãos variou entre 2,8 mm e 6,1 mm, com valores médios de cerca de 4,4 mm e por Salinas; Arellano e

Martinez (1992), que verificaram em milho híbrido uma variação na espessura dos grãos de 3,9 mm a 4,5 mm.

A largura das amostras situou-se entre 7,7 mm e 10,9 mm. Estes dados diferem dos relatados por Coskun; Yalçin e Özarslan (2006), em que 89% das amostras analisadas encontravam-se na faixa entre 6,0 e 9,0 mm, e Salinas; Arellano e Martinez (1992), em que a largura das amostras analisadas esteve entre 6,3 mm e 7,0 mm.

Os dados são semelhantes aos apresentados por Teixeira et al. (2003), em que a largura das variedades analisadas variou entre 6,8 mm e 10,2 mm. Através da análise de variância foi possível verificar uma diferença estatística ($p < 0,05$), entre as variedades analisadas. Segundo dados apresentados por Carvalho et al. (1993), quanto maior a largura do grão maior a sua taxa de germinação e vigor da semente. Das amostras analisadas as que apresentaram uma maior largura no grão foram as variedades V2, V5, V14, V16 e V18.

Já para a determinação do comprimento do grão os resultados variaram entre 9,5 mm e 13,9 mm, dados semelhantes foram apresentados por Coskun; Yalçin e Özarslan (2006) em que 89% das amostras encontraram-se entre 6,0 e 9,0 mm. Teixeira et al. (2003) verificaram uma variação entre 8,5 mm e 13,1 mm e Salinas; Arellano e Martinez (1992) que encontraram uma variação entre 10,3 mm e 14,5 mm. Através de análise de variância verificou-se que existe diferença estatística entre as variedades ($p < 0,05$).

O diâmetro das variedades analisadas esteve entre 7,0 mm e 8,4 mm, sendo que as variedades foram consideradas através da análise de variância diferentes estatisticamente entre si ($p < 0,05$). Resultados semelhantes foram citados por Coskun; Yalçin e Özarslan (2006).

Na Figura 15 é apresentada a frequência de distribuição da espessura, largura e comprimento nos grãos analisados.

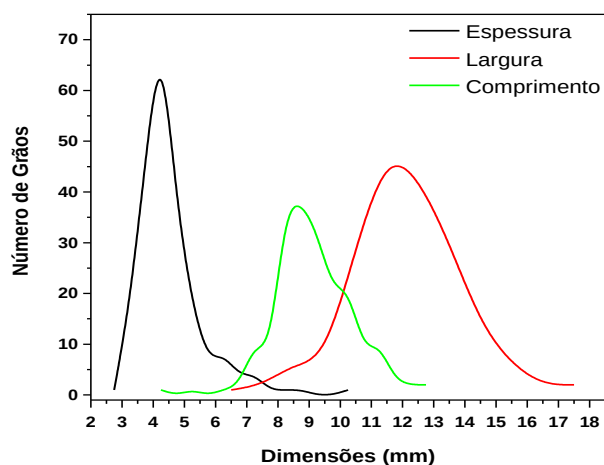


Figura 15 - Frequência de distribuição dos grãos quanto ao seu tamanho, em espessura, largura e comprimento.

Através da análise da Figura 15 verifica-se uma dispersão nos dados das variedades analisadas para as características espessura, comprimento e largura, esta dispersão dos dados é comum para amostras de diferentes variedades segundo Sandhu; Singh e Malhi (2007).

Esta variabilidade nos dados de espessura, comprimento, largura e diâmetro, podem influenciar os testes de força necessária até a ruptura dos grãos, devido aos diferentes formatos dos grãos analisados.

5.1.7 Análise da força necessária até a ruptura dos grãos

A Força (N) requerida para a ruptura do grão de milho está representada nas Figuras 16 a 20, onde a legenda representada por E refere-se ao número do ensaio realizado.

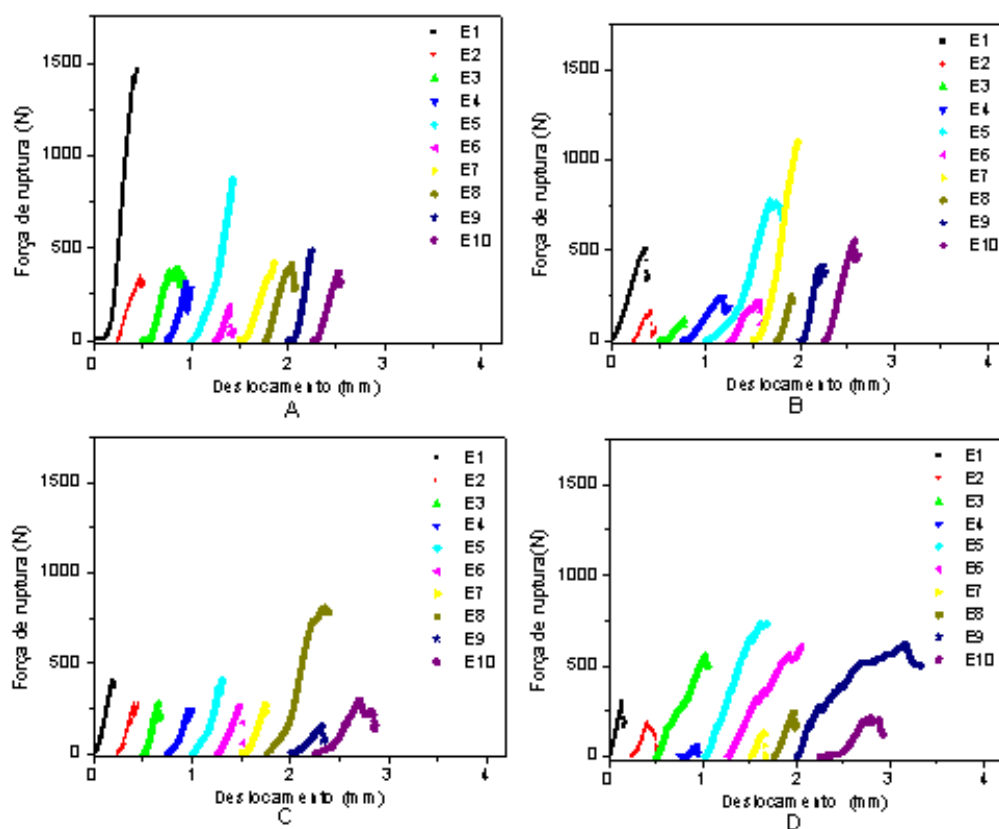


Figura 16 - Forças de ruptura, A: Variedade 1, B: Variedade 2, C: Variedade 3 e D: Variedade 4.

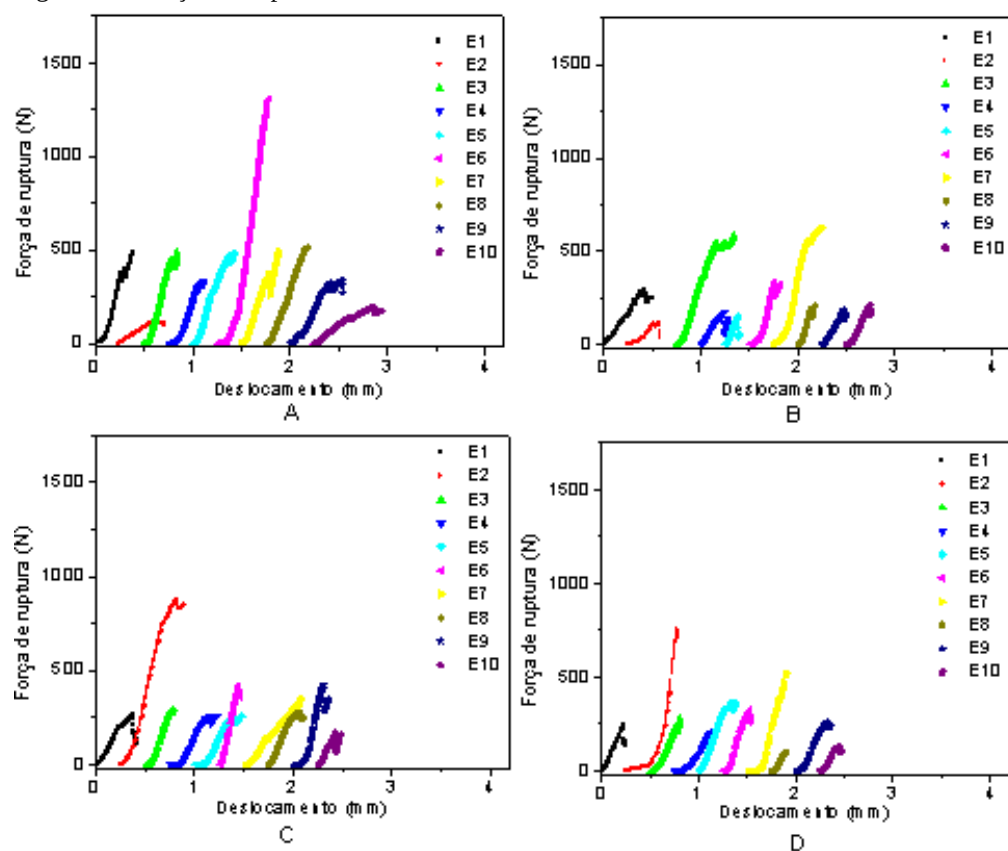


Figura 17 - Forças de ruptura, A: Variedade 5, B: Variedade 6, C: Variedade 7 e D: Variedade 8.

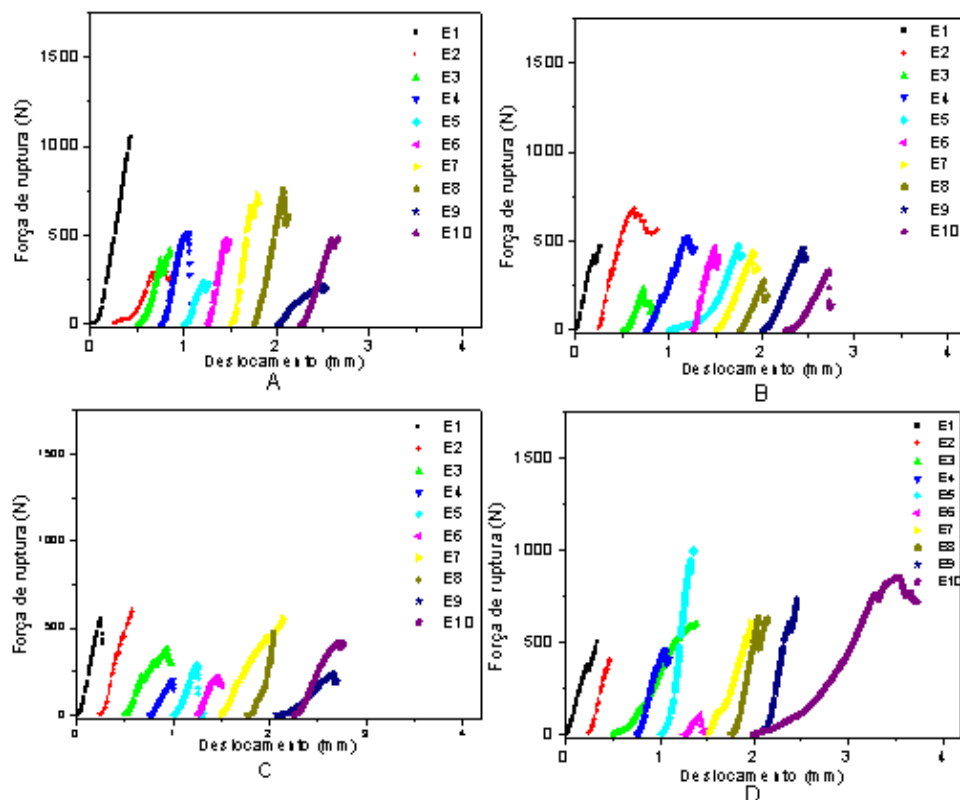


Figura 18 - Forças de ruptura, A: Variedade 9, B: Variedade 10, C: Variedade 11 e D: Variedade 12.

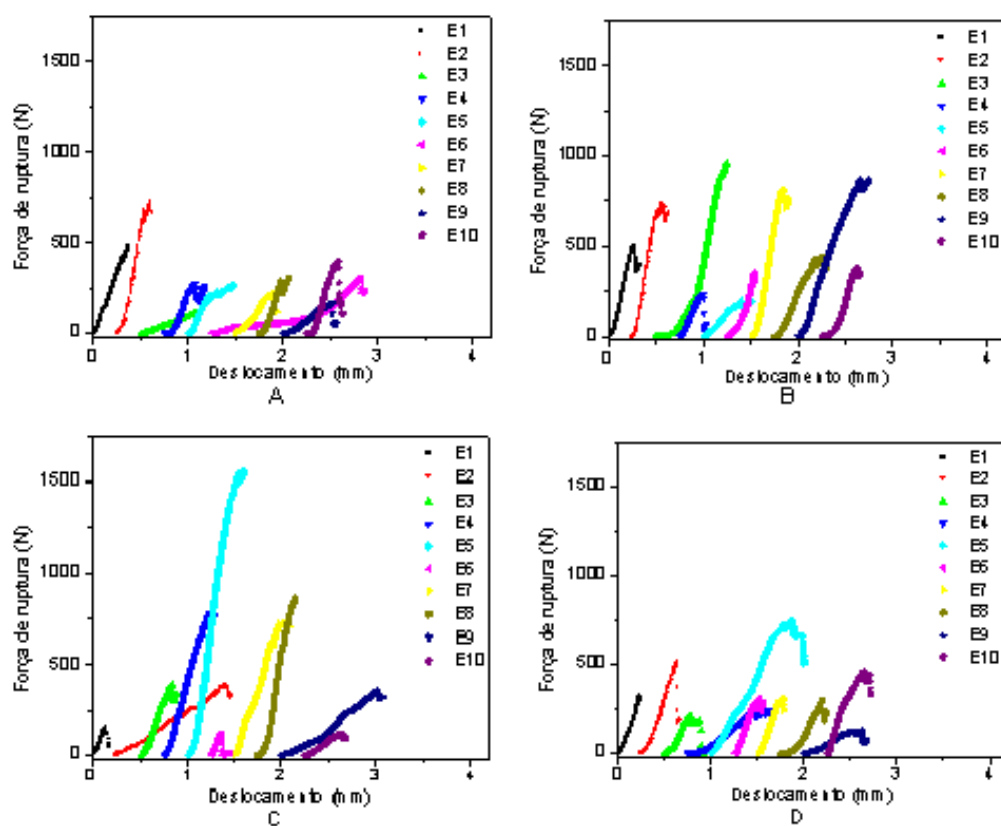


Figura 19 - Forças de ruptura, A: Variedade 13, B: Variedade 14, C: Variedade 15 e D: Variedade 16.

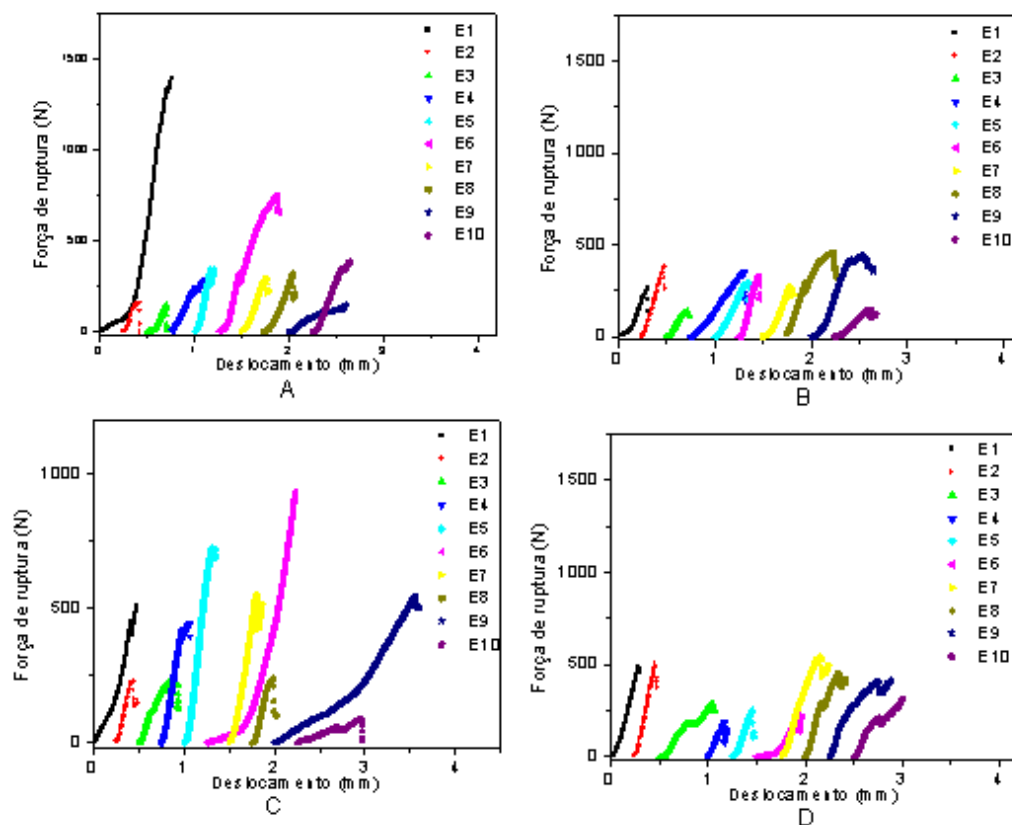


Figura 20 - Forças de ruptura, A: Variedade 17, B: Variedade 18, C: Variedade 19 e D: Variedade 20. A força de ruptura esteve entre 267 N e 507 N (Tabela 15).

Tabela 15 - Valores médios de força de ruptura das variedades analisadas.

Variedades	FR(N)
V1	458±190,1 a
V2	370±155,9 b
V3	322±53,6 b
V4	328±178,3 b
V5	289±127,1 b
V6	346±155,2 b
V7	332±67,2 b
V8	311±113,7 b
V9	379±120,4 b
V10	507±87,6 a
V11	441±140,2 a
V12	501±118,5 a
V13	313±79,5 b
V14	431±203,1 a
V15	267±139,3 b
V16	302±80,7 b
V17	369±190,7 b
V18	378±73,6 b
V19	323±159,8 b
V20	354±137,8 b

Amostras seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de *Scott Knott*.

Esta variação de resultados é próxima ao relatado na literatura. Sandhu; Singh e Malhi (2007) encontraram valores de força de ruptura para milho híbrido que variaram entre 346,17N e 738,44N. Verma e Prasad, (2000) obtiveram variações na força de ruptura entre 156N e 689 N. Delalibera et al. (2008), analisando amostras de milho híbrido em grão da região dos Campos Gerais – PR encontraram uma variação entre 296,7 N e 548,9 N. A variação é advinda, principalmente, das diferenças no formato dos grãos.

Segundo Gupta e Das (2000) e Singh e Goswami (1998) a força de ruptura decresce conforme o teor de umidade aumenta, mas como já foi observado na Tabela 10 a umidade não variou significativamente entre as variedades analisadas, portanto a umidade das amostras não interferiu nestes dados, situação também observada por Delalibera et al. (2008).

Na análise das curvas de força de ruptura percebe-se que alguns ensaios possuem dois picos, o primeiro deles, segundo Singh e Goswami (1998), é o ponto onde os danos ao grão foram iniciados, e o segundo é onde ocorre a força compressiva máxima, a força além deste pico não é considerada, pois após este ponto o grão somente é esmagado. Sendo assim, somente o segundo pico é considerado na análise dos dados.

Na Figura 23 verifica-se as médias das forças de ruptura das variedades analisadas, com os seus respectivos desvios padrão.

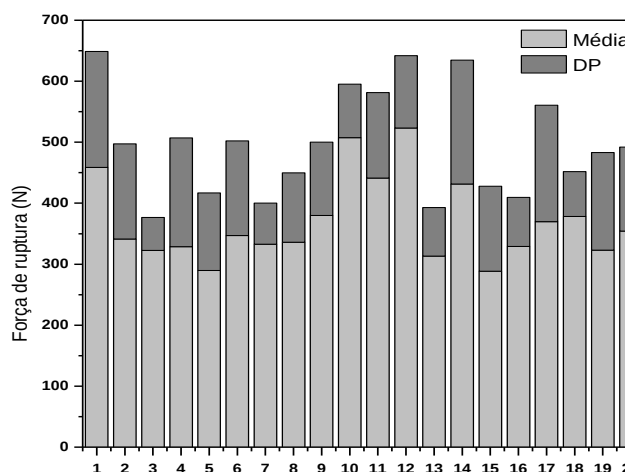


Figura 21 - Médias das forças de ruptura das variedades crioulas de milho analisadas.

A importância da análise de força de ruptura do grão pode estar relacionada à resistência ao ataque por insetos e fungos, pois sugere-se que quanto menor a força necessária até a ruptura do grão, maior seria a probabilidade de ataque do grão por insetos, devido à facilidade de penetração no endosperma (BÚTRON et al., 2009).

5.1.8 Relações entre as características físicas e químicas dos grãos

Os teores de umidade, proteína bruta, lipídeos, fibra alimentar total, cinzas, fibra bruta e carboidratos disponíveis correlacionaram-se como apresentado na Tabela 16.

Tabela 16. Matriz de correlação entre as variáveis químicas.

	Um	PB	Lip	Cz	FAT	FB	CD
Um		-0.52*	-0.26	-0.16	0.03	-0.03	0,01
PB			0.49*	-0.08	-0.20	-0.02	-0,04
Lip				-0.08	0,03	-0,03	-0,27
C					0,36	-0,17	-0,34
FAT						0,50*	-0,95**
FB							-0,47*
CD							

* Significativo ($p < 0,05$), **Significativo ($p < 0,01$). Um: Umidade. PB: Proteína Bruta. L: Lipídeos. Cz: Cinzas. FAT: Fibra Alimentar Total. FB: Fibra Bruta. CD: Carboidratos Disponíveis.

Na Tabela 16 verifica-se que o teor de proteína bruta teve uma correlação negativa ($r = -0,52$) significativa ($p < 0,05$) com o teor de umidade das amostras e uma correlação positiva com o teor de lipídeos ($r = 0,49$) significativa ($p < 0,05$). Pode-se

perceber, portanto que as variedades com maiores teores de lipídios, são também as que possuem maiores teores de proteína bruta, podendo ser exploradas para a alimentação humana (V1, V2, V6, V9, V12, V13, V14 e V18). Mazzuco et al. (2002) verificaram em diferentes temperaturas de secagem que os teores de proteínas e lipídeos correlacionaram-se inversamente ($r = -0,56$), podendo este fator ter influenciado esta correlação obtida neste estudo. Segundo Paes (2008) o milho que possui uma maior concentração de lipídeos, tem geralmente um maior gérmen, o que resulta em uma maior concentração e melhor qualidade da proteína do grão.

A FAT correlacionou-se positivamente ($r = 0,50$) com o teor de FB presente nas amostras analisadas, sendo esta correlação significativa ($p < 0,05$). Esta correlação era esperada, pois os dois métodos quantificam o teor de fibra presente no grão, através de metodologias diferenciadas.

Tanto a FB, quanto a FAT, correlacionaram negativamente com o teor de CD ($r = -0,47$ e $r = -0,95$) ($p < 0,05$) e ($p < 0,01$) respectivamente. Dados semelhantes foram encontrados por Callegaro et al. (2005). Isto ocorreu devido a amostra se tratar de grão integral, sendo assim possui alto nível de fibra alimentar total e fibra bruta, e quanto maior o teor de fibra alimentar total e fibra bruta menor o de carboidratos disponíveis presente na amostra, já que este é obtido por diferença entre os constituintes analisados.

Na Figura 21 estão representados os gráficos dos coeficientes de correlação considerados significativos para as características físico-químicas.

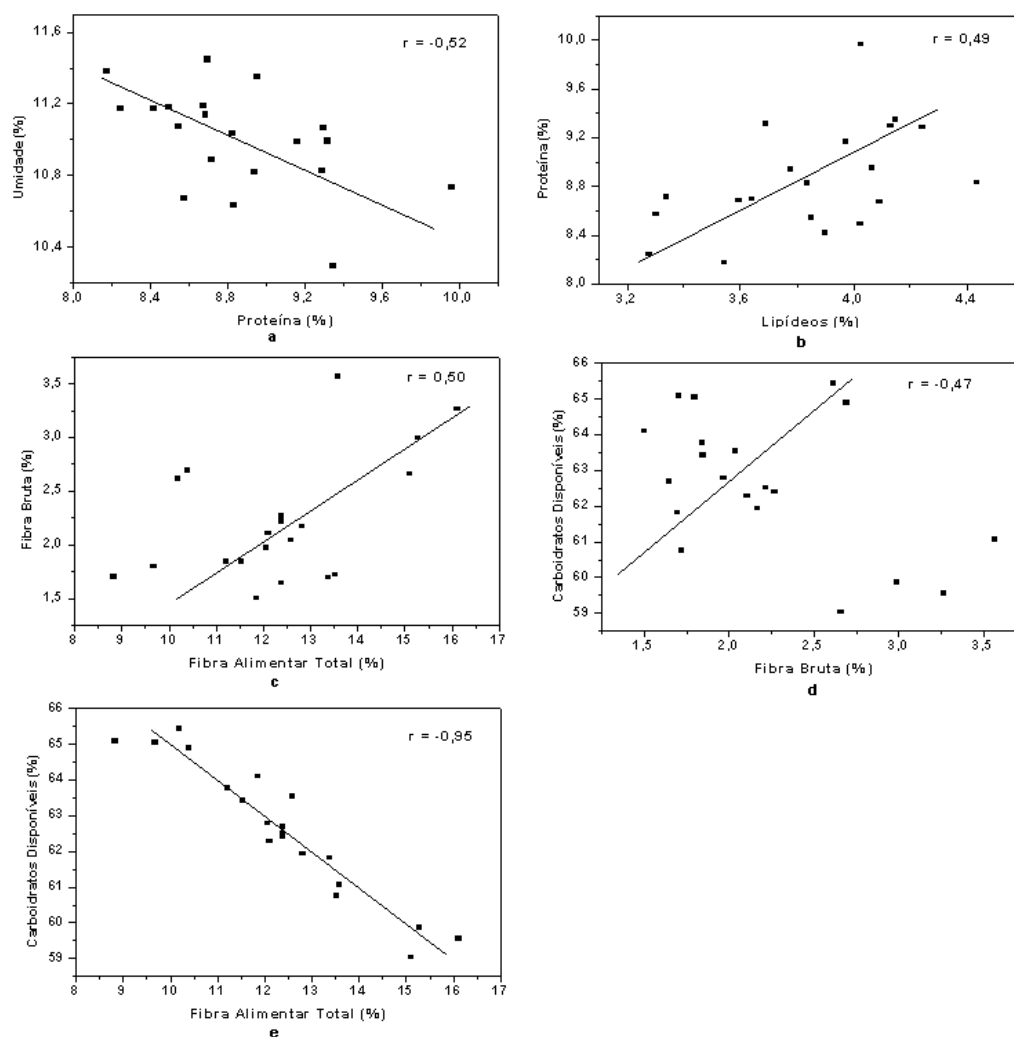


Figura 22: Gráficos das correlações consideradas significativas, para as características químicas. a. Proteína x Umidade, b. Lipídeos x Proteína, c. Fibra alimentar total x Fibra bruta d. Fibra bruta x Carboidratos disponíveis, e. Fibra alimentar total x Carboidratos disponíveis.

As vinte variedades de milho foram também exploradas pela análise de componentes principais (PCA) quanto à relação entre os teores de umidade, cinzas, lipídeos e proteínas, a densidade e a força de ruptura. Os valores foram tabelados, formando uma matriz 20 x 6, que foi utilizada para a PCA. O pré-processamento utilizado foi o autoescalamento, com o qual se conseguiu 96,32% de informação com cinco componentes principais.

A Figura 23 mostra os gráficos PCA de escores e pesos das variáveis analisadas

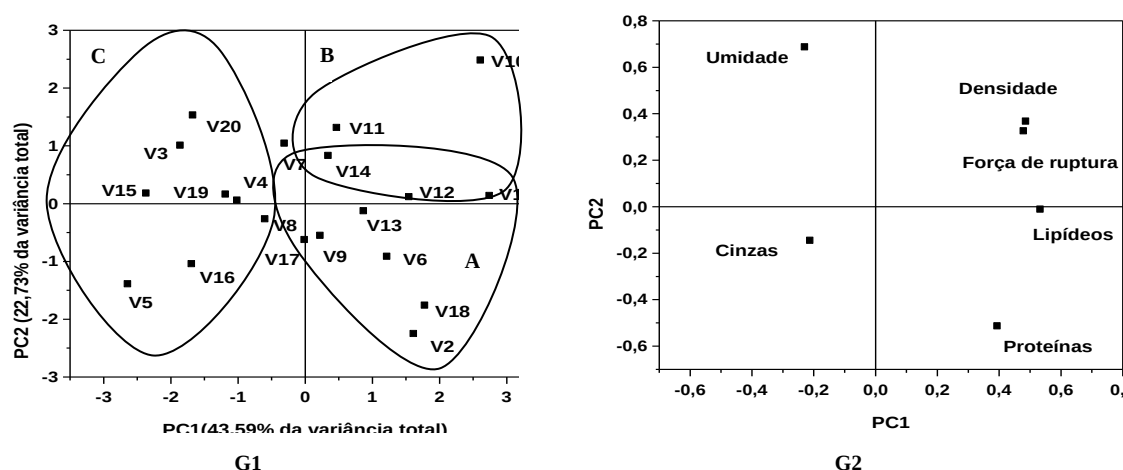


Figura 23 - Gráfico dos escores (G1) e pesos (G2) das amostras de milho crioulo analisadas pela PCA, quanto às características físicas e químicas.

A Figura 23 apresenta o mapa de escores e pesos entre os dois componentes principais (PC1 e PC2), demonstrando uma distinção entre as variedades de milho estudadas. Correlacionando-se o gráfico de escores (G1) com o de pesos (G2) verifica-se que as amostras podem ser classificadas de acordo com seu valor nutricional e suas características físicas. Assim sendo, os gráficos de escores e pesos foram divididos em três grupos, para melhor visualização das variáveis que contribuíram para a elaboração deste modelo.

O primeiro grupo (A) identificou as amostras V1, V2, V6, V9, V12, V13, V14 e V18 como as de maior concentração de proteínas e lipídeos, neste mesmo grupo as amostras denominadas V1, V12 e V14, apresentaram concomitantemente valores altos de densidade e força de ruptura, sendo portanto as variedades com maior interesse comercial, por possuírem altos valores nutricionais e maior resistência a quebra. A amostra V9 apresentou alto teor protéico, porém baixo teor lipídico.

O segundo grupo (B) identificou as amostras V1, V10, V11, V12 e V14 como as que possuíam os maiores valores de densidade e força de ruptura.

O terceiro grupo (C) composto pelas amostras V3, V4, V5, V7, V8, V15, V16, V17, V19 e V20, identificou-as como sendo as amostras com os maiores teores de umidade e cinzas, destas amostras destaca-se as amostras V15 e V20 como as amostras

com os maiores teores de umidade e as amostras com maior teor de cinzas como sendo as V5 e V17. Com esta divisão podem-se realizar a classificação em variedades de milho de maior interesse comercial/nutricional (A), variedades mais resistentes à quebra (B) e variedades com maior teor de cinzas e menor valor nutricional (C).

As amostras agrupadas em (A), podem ser destinadas em maior proporção para a alimentação humana, visto que possuem grande quantidade de proteínas e lipídeos, nutrientes importantes e valorizados pelo mercado de alimentos. Já as amostras presentes no grupo (C), podem ser exploradas para a alimentação animal, pois mesmo não sendo as amostras com maior valor nutricional possuem valores médios de proteínas e lipídeos e podem ser utilizadas para este fim.

Para as variedades presentes no grupo (B) a densidade e a força de ruptura são fatores fundamentais, pois, com a necessidade de uma força maior para ocorrer a ruptura do grão, mais dificilmente ocorrerá a abertura do grão, diminuindo a exposição do endosperma a vetores e a contaminação microbiológica. Uma análise de HCA (análise de componentes hierárquicos) foi realizada para comprovar a divisão dos grupos em categorias hierárquicas.

Na Figura 24 tem-se o gráfico de HCA realizado com as vinte variedades em estudo, levando em consideração as análises de proteína bruta, lipídeos, umidade, cinzas, densidade e força de ruptura, as amostras foram agrupadas pelo método de conexão incremental utilizando-se a distância euclidiana para a análise exploratória.

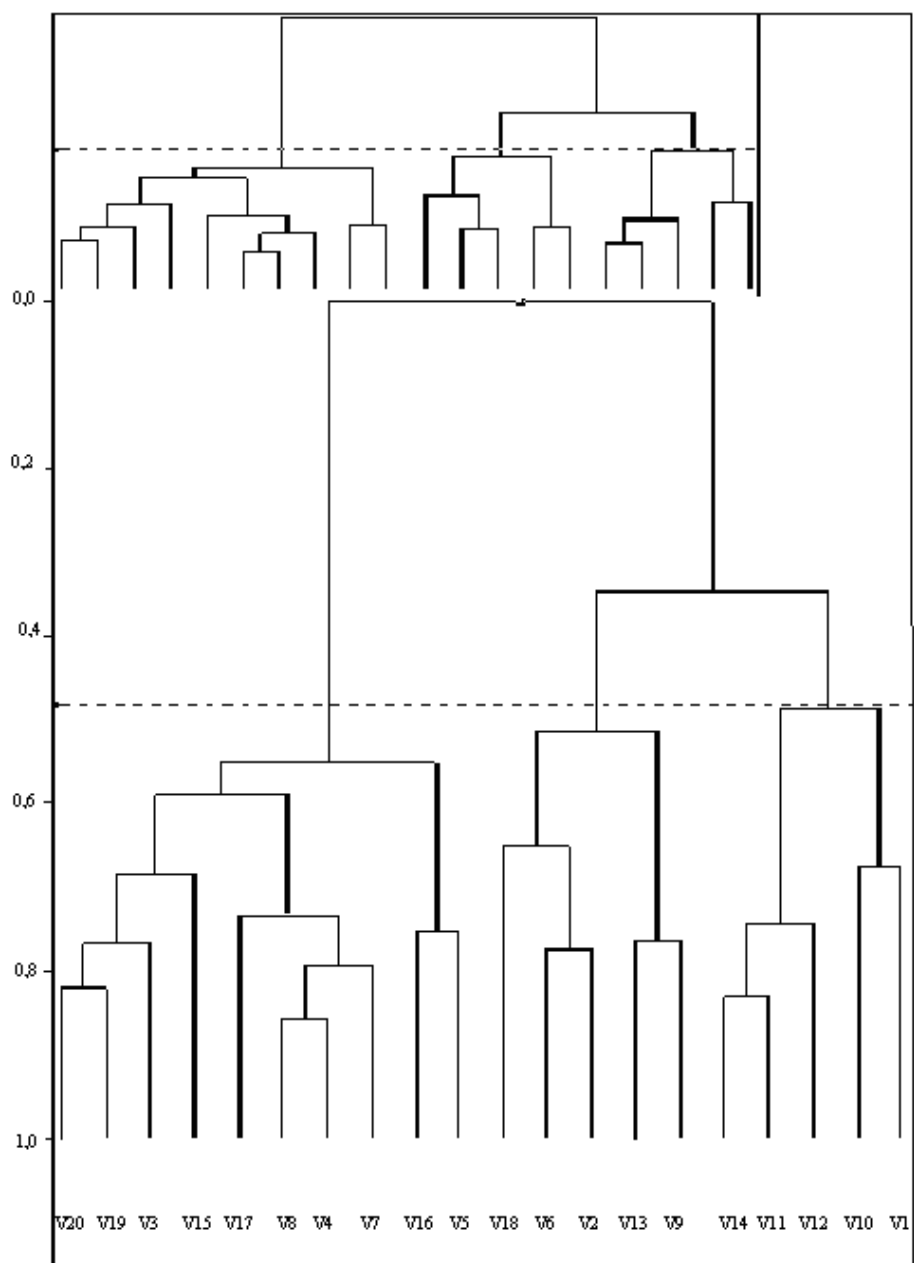


Figura 24. Dendrograma de HCA (análise de componentes hierárquicos) das 20 variedades em estudo.

Na análise de HCA, o pré-processamento utilizado foi o autoescalado na forma incremental. Para as amostras presentes na Figura 26 ocorreu a formação de três grupos, ao se usar um grau de similaridade de 0,482. Na parte esquerda do dendrograma encontra-se vinte amostras, das quais dez (preto) apresentam maior teor de umidade e cinzas, cinco (azul) discriminam as amostras com maior teor de proteínas e lipídeos e cinco (cinza) as que possuem maior densidade e força de ruptura. Uma nova análise de

PCA foi realizada com o objetivo de avaliar a relação entre todas as características físicas das variedades de milho.

Uma nova análise de PCA foi realizada, avaliando a relação entre as características de densidade, força de ruptura, diâmetro e peso de 1000 grãos, obtendo-se uma matriz 20 x 4, que foi utilizada para a PCA (Figura 25). O pré-processamento utilizado foi o autoescalamiento, com o qual se conseguiu 97,65% de informação com quatro componentes principais.

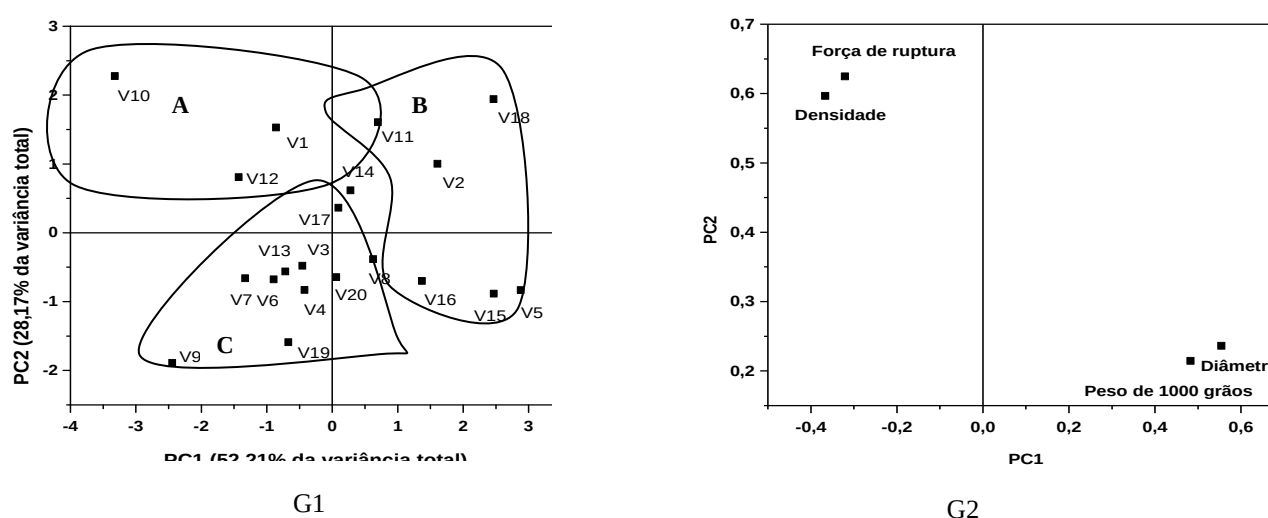


Figura 25 - Gráfico dos escores (G1) e pesos (G2) das amostras de milho crioulo (grãos) analisadas pela PCA, quanto às características físicas.

A Figura 25 apresenta os mapas de escores e pesos entre os dois componentes principais (PC1 e PC2), que demonstram uma distinção entre as variedades de milho estudadas. Correlacionando-se o gráfico de escores (G1) com o de pesos (G2), verifica-se que as amostras podem ser classificadas de acordo com algumas das suas características físicas. Assim sendo, os gráficos de escores e pesos foram divididos em três grupos distintos, para melhor visualização das variáveis que contribuíram para a elaboração deste modelo. Dentro do primeiro grupo (A) as amostras identificadas pelas mesmas características foram a V1, V10, V11, V12 e V14. Estas amostras estão agrupadas por possuírem altos valores de densidade e por necessitarem de uma maior

força (N) até a ruptura do grão. Características desejáveis para uma maior resistência dos grãos ao ataque de insetos e conseqüentemente de fungos, portanto são identificadas como as amostras mais resistentes à quebra dentre as estudadas. Estas variáveis podem estar relacionadas com a textura do endosperma (duro ou macio) e são altamente relacionadas entre si (NARVÁEZ-GONZÁLEZ et al., (2006), SALINAS; ARELLANO; MARTINEZ (1992)).

No segundo grupo (B) presente na Figura 25 (G1), foram identificadas as amostras V2, V5, V11, V15, V16 e V18, como as variedades com os maiores valores de diâmetro e peso de 1000 grãos. Estas variedades podem ser consideradas como as que possuem os grãos de maior peso e tamanho, sendo que esta característica, segundo Tolenaar e Wu (1999) é um dos fatores para a um maior rendimento de uma variedade de milho. As amostras V3, V4, V6, V7, V8, V9, V13, V17, V19 e V20, contidas no terceiro grupo (C) da Figura 25 (G1), são amostras consideradas com características intermediárias entre as avaliadas.

Portanto as 20 variedades de milho crioulo podem ser distribuídas em três grupos com relação às características físicas. Em (A) encontram-se as amostras consideradas de maior resistência mecânica, em (B) as amostras de grãos de maior tamanho e em (C) as amostras com características intermediárias entre as demais. A matriz de correlação entre as variáveis físicas é apresentada na Tabela 17.

Tabela 17 - Matriz de correlação das características físicas dos grãos

	D	IF	DGM	P1000	Dia	FR
D		-0,48*	-0,44	-0,16	-0,40	0,46*
IF			0,26	0,36	0,51*	-0,52*
DGM				-0,03	0,03	-0,14
P1000					0,66**	-0,17
Dia						-0,20
FR						

* Significativo ($p < 0,05$), ** Significativo ($p < 0,01$). D: Densidade. IF: Índice de flotação. DGM: Diâmetro Geométrico médio. P1000: peso de 1000 grãos. Dia: Diâmetro. FR: Força de ruptura.

Através da análise de correlação de *Pearson* foi possível verificar correlações significativas entre as variáveis físicas e mecânicas. Assim, verifica-se que a força de ruptura correlacionou-se de maneira significativa e com a densidade dos grãos ($r=0,46$) e com o índice de flotação ($r=-0,52$), indicando que quanto mais duro for o endosperma do grão, mais denso ele será e menos susceptível ele estará à ruptura (WATSON; RAMSTAD, 1987; SALINAS; MARTINEZ; GOMEZ, 1992 e DUARTE et al., 2007).

Segundo Delalibera et al. (2008), a proporção de endosperma duro no grão de milho influencia as propriedades mecânicas do mesmo, tendo sido obtido no estudo realizado uma correlação positiva entre a força necessária até a ruptura e a quantidade de endosperma duro. Portanto a variabilidade dos dados ocorre principalmente devido as diferenças na textura dos grãos, quanto à proporção de endosperma duro e macio (SANDHU; SINGH; MALHI, 2007). Resultados semelhantes foram citados por Pomeranz et al. (1984), Leford e Russel (1985), Watson e Ramstad (1987), Jamim e Flores (1998), Kirleis e Stroshine (1990) que analisaram milho híbrido com origem nos Estados Unidos, Salinas; Martinez e Gómez (1992) e Duarte et al. (2007), que analisaram milho híbrido na condição safrinha no Brasil.

A força de ruptura não se correlacionou significativamente com o peso de 1000 grãos corroborando os resultados apresentados por Duarte et al. (2007), Sandhu; Singh e Malhi (2007) e Kniep e Mason (1989). Outro fator que está relacionado com o peso dos grãos é a sua constituição quanto à proporção entre endosperma duro e macio. Quanto maior a quantidade de endosperma duro, maior o peso de 1000 grãos, devido a uma maior compactação celular (NARVÁES-GONZÁLEZ et al., 2006). Isto não foi encontrado no presente estudo, já que a correlação entre estas duas variáveis não pode ser considerada significativa.

O índice de flotação que, segundo Salinas; Martinez e Gómez (1992), pode ser considerado como uma medida relativa da densidade, teve uma correlação negativa significativa com a densidade dos grãos, sugerindo que quanto maior a proporção de endosperma duro no grão, maior será a sua densidade e menor o índice de flotação.

O índice de flotação correlacionou-se negativamente com o diâmetro. Isto indica que quanto maior a proporção de endosperma suave no grão, maior o seu tamanho. Resultados semelhantes foram apresentados por Salinas; Arellano e Martinez (1992) e Narváez-Gonzalez et al. (2006). O peso de 1000 grãos correlacionou-se significativa e positivamente com o diâmetro, indicando que quanto maior o peso dos grãos, maior o diâmetro. As proporções dos grãos, indicadas pelo diâmetro, se correlacionaram com as forças de ruptura negativamente, indicando que quanto maior o diâmetro dos grãos analisados, menor é a força necessária para a ruptura dos grãos, embora esta correlação não seja considerada significativa estatisticamente. Estes resultados são semelhantes aos relatados por Delalibera et al. (2008), em milho híbrido da região dos Campos Gerais no Paraná, Br. Na Tabela 18 é apresentada a matriz de correlação entre as variáveis físicas e químicas.

Tabela 18. Matriz de correlação entre dados físicos, químicos dos grãos.

	D	IF	DGM	P1000	Dia	FR
Um	-0,27	0,05	-0,06	-0,25	-0,24	0,03
PB	0,23	-0,07	-0,26	0,43	0,18	0,30
L	0,58**	-0,30	-0,27	0,00	-0,14	0,60**
C	-0,34	0,26	0,43	0,35	-0,06	-0,06
FAT	-0,11	0,01	0,16	-0,34	0,06	0,02
FB	-0,08	0,01	0,10	-0,28	0,07	0,01
CD	0,00	0,04	-0,05	0,26	-0,06	-0,2

* Significativo ($p < 0,05$), ** Significativo ($p < 0,01$).

Analisando-se os valores apresentados na Tabela 18 percebe-se que as únicas correlações significativas são entre o teor de lipídeos e a densidade ($r=0,58$) e entre o teor de lipídeos e a força de ruptura ($r=0,60$), ambas são significativas ($p<0,01$). Estas correlações indicam que quanto maior o teor de lipídeos maior é a densidade e a resistência à ruptura da amostra.

O índice de flotação também apresentou uma correlação negativa com o teor de lipídeos ($r=-0,3$), indicando que quanto menor a proporção de endosperma macio maior o teor de lipídeos, muito embora esta correlação não possa ser considerada significativa. As correlações obtidas entre o teor de lipídeos e a densidade e força de ruptura foram, provavelmente, influenciadas pelo teor de proteínas, já que a proteína é um constituinte mais denso que o lipídeo e fornece ao grão um maior resistência.

Estes resultados são semelhantes aos relatados por Narváez-González et al. (2007), em que o teor de lipídeos foi maior nos grãos com um grânulo de amido menor, indicando que o teor lipídico é maior em endospermas mais duros. Segundo Bertolini et al. (2003), a biossíntese de amido e a de lipídeos estão altamente relacionadas.

5.1.9 Análises fúngicas

Na Tabela 19 estão apresentados os níveis de contaminação fúngica verificada nos grãos das 20 variedades crioulas de milho analisadas. Os resultados representam a média de contaminação de 400 grãos por variedade

Tabela 19. Percentagem de contaminação fúngica nos grãos.

Variedades	<i>Fusarium sp</i>	<i>Aspergillus sp</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>Diplodia sp</i>	<i>Rizhopus sp</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>Alternaria sp</i>	<i>Rhizoctonia sp</i>
Nutricional n° 61	24,7 a	0,5 f	64,7 j	6,5 b	4,2 j	0 f	0,2 b	0 c
Grande n° 52	15,2 g	0 g	78,2 g	0 f	15,2 d	0,2 f	0 c	0 c
Palha Roxa n° 72	16,7 f	0 g	86 d	2,5 d	5,7 i	0,2 f	0 c	0 c
Patol n° 49	11,7 h	1,2 d	81,2 e	0,7 f	32,2 a	0,2 f	0 c	0 c
Branco n° 57	21,5 c	0 g	80,5 ef	0 f	12 f	3,2 a	0 c	0 c
Asteca n° 60	11,5 hi	0 g	88,5 c	2,5 d	0,5 o	1,5 c	0 c	0 c
Caiano n° 63	22,2 c	0 g	74,5 h	3,7 c	0 o	0 f	0 c	0 c
Roxo Índio I n° 06	22,2 c	0 g	76 h	3,7 c	0 o	0 f	0 c	0 c
Branco para palha n° 69	7,5 m	0 g	78,7 fg	0,2 f	21,2 b	1,0 d	0 c	0 c
Pérola n° 65	10,7 ij	0,7 e	83,7 d	0,5 f	0,5 o	0,2 f	0,7 a	0 c
Carioca n° 68	6,7 m	0 g	92,5 b	0,7 f	5,2 i	2,2 b	0 c	0 c
Astequinha sabugo fino n° 70	10,2 j	0 g	41 m	3,2 c	1,7 m	0,2 f	0 c	0 c
Viniém n° 56	17,7 e	0 g	71 i	0 f	1,0 n	1,7 c	0 c	0,2 b
Palha Roxa n° 64	8,2 l	2 c	33 n	0,5 f	6,7 h	0 f	0 c	0 c
Encantilado n° 59	12,0 hi	0 g	48 l	1,75 e	10,5 g	0,7 e	0 c	0 c
Branco n° 62	5,5 n	4,2 a	22 o	0 f	19,5 c	0 f	0 c	0 c
Amavelo antigo n° 71	10,5 j	2,7 b	42 m	2,2 de	10,5 g	0 f	0 c	0,5 a
Cruculo Oito Caneiras n° 41	18,7 d	0,2 g	75 h	2,5 d	13,7 e	0 f	0 c	0 c
Cruculo Purunca n° 38	11,7 h	0 g	47 l	13 a	5,2 i	0 f	0 c	0 c
Caiano Rajado n° 16	24 b	0,7 e	96 a	0,2 f	3,2 l	0 f	0 c	0 c
Média	14,5	1,6	67,9	2,2	8,9	1,0	0,5	0,37

Amostras com a mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente através do teste de Tukey ($p < 0,01$).

A análise de contaminação fúngica das 20 variedades de milho crioulo estudadas revelou a presença de oito gêneros fúngicos. Foi possível verificar que 100% das variedades analisadas apresentaram contaminação por *Fusarium* sp e *Penicillium* sp, 90% apresentaram contaminação por *Rizhopus* sp, 80% apresentaram contaminação por *Diploidia* sp, *Macrophomina phaseolina* também foi detectada em 55% das variedades analisadas assim como *Aspergillus* sp foi detectado em 40% das variedades e ainda em 10% das variedades foi verificada a presença de *Alternaria* sp e *Rhizoctonia* sp (Tabela 19).

O fungo de maior incidência foi o *Penicillium* sp, contaminando cerca de 68% dos grãos analisados de cada variedade (Figura 26). *Fusarium* sp esteve presente em cerca de 15% nos grãos analisados de cada variedade.

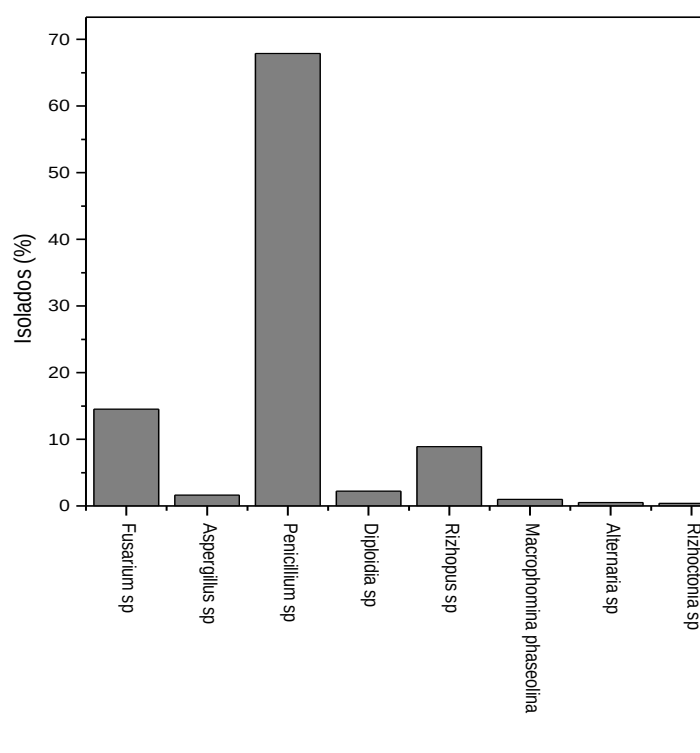


Figura 26 - Percentagem média de fungos identificados nos grãos de todas as variedades analisadas.

A predominância de *Penicillium* sp e *Fusarium* sp em milho em grão, também foram relatadas por Almeida et al. (2000), González et al. (2005), Ribeiro et al. (2005), Atui e Lazzari, (1998), Farias et al. (2000) e Casa et al. (2007).

Segundo Leal et al. (2005) *Fusarium* sp é isolado em maiores proporções nos estados do sul do Brasil, devido à alternância entre dias quentes e noites frias, o que favorece o desenvolvimento fúngico. Atui e Lázzari (1998) comentam que *Fusarium* sp é considerado um fungo de campo, portanto, não se desenvolve em condições de armazenamento, exceto em condições de temperatura e umidade inferiores.

Segundo Ribeiro et al. (2003), a contaminação por estes fungos se deve principalmente ao alto índice de umidade no campo. Atui e Lázzari (1998) verificaram a presença de *Aspergillus* sp em 100% das amostras analisadas, de *Fusarium* sp em 97,5% e *Penicillium* sp em 82,7%.

As médias de precipitação nos meses de cultivo e colheita das variedades analisadas estão apresentadas na Tabela 20.

Tabela 20. Precipitação pluviométrica (mm) na região de Ponta Grossa, nos meses de outubro 2006 a março 2007.

Mês	Precipitação (mm)
Outubro 2006	84,4
Novembro 2006	189
Dezembro 2006	91,6
Janeiro 2007	158,2
Fevereiro 2007	168
Março 2007	82,4

Fonte: SIMEPAR (2007).

Pela Tabela 20, percebe-se um aumento da precipitação pluviométrica do mês de novembro de 2006 a fevereiro de 2007, esta precipitação pode ter favorecido a contaminação dos grãos por *Fusarium* sp no campo.

Segundo Reis e Casa (1999), *Penicillium* é considerado um fungo xerofílico, que somente se desenvolve nos grãos quando a umidade esta entre 13 e 20%, infecta primeiramente o gérmen e posteriormente o endosperma do grão.

Os grãos analisados não passaram por um processo de secagem antes do armazenamento, o que pode ter favorecido o desenvolvimento de *Penicillium* sp.

Rhizopus sp foi isolado em uma proporção média de 9% nos grãos analisados de cada variedade, seguido por *Diplodia* sp com uma proporção de contaminação nos grãos analisados de 2,2%. *Aspergillus* sp foi isolado em uma proporção de 1,6% dos grãos analisados. *Macrophomina phaseolina* foi detectado na proporção de 1,0% nos grãos de cada variedade, *Alternaria* sp foi detectado na proporção de 0,5% e *Rhizoctonia* sp foi detectado em uma proporção de 0,37% nos grãos analisados. Dados semelhantes foram citados por Tanaka et al. (2001), Almeida et al. (2000), Ribeiro et al. (2003) e Pozzi et al. (1995) em grãos de milho.

Denti e Reis, (2003), avaliaram amostras de grãos de milho híbrido do Planalto Gaúcho (RS) e Campos Gerais (PR), verificando a presença de *Colletotrichum graminicola* (22,6%), *Fusarium graminearum* (18%), *Diplodia maydis* (7,7%), *D. macrospora* (3,5%), *F. moniliforme* (15,2%) e *F. subglutinans* (6,3%), *Nigrospora* sp (2,2%), *Aspergillus* sp (2,1%), *Penicillium* sp (1,8%), *Cephalosporium* sp (1,4%), *Bipolaris zeicola* (1,4%) e *Trichoderma* sp (0,5%). Os autores encontraram contaminação semelhante a detectada no presente estudo.

Atui e Lázari (1998) enfatizam que *Rhizopus* sp é considerado um fungo contaminante, pois está presente normalmente no solo e em locais de armazenamento. A presença destes fungos é um indicativo da provável presença das micotoxinas, esta presença ocorre normalmente devido a deficitárias condições de armazenamento.

A percentagem de fungos detectadas nas variedades em estudo foi significativamente diferente ($p < 0,01$) para todos os fungos em todas as variedades.

Das variedades analisadas as que apresentaram uma maior contaminação fúngica foram a V20 e V4, sugere-se que estas variedades, dentre as estudadas, sejam as mais

susceptíveis ao ataque fúngico e as variedades que podem ser consideradas através deste estudo como as menos susceptíveis ao desenvolvimento fúngico são as variedades V14, V12 e V16, por terem apresentado uma menor contaminação fúngica.

5.1.10 Relação entre a contaminação fúngica e as características físicas, químicas e mecânicas dos grãos analisados

Através da análise apresentada na Tabela 21 percebe-se que dentre os fungos isolados, os únicos que se correlacionaram significativamente foram *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp ($r=-0,62$).

Tabela 21. Matriz de correlação entre a contaminação fúngica e características físicas.

	FR	Dpic	P1	Dia	IF	DGM	Fu	As	Pe	Di	Ri	Ma	Al	Ri2
Fu	-0,21	0,20	-0,03	0,19	0,59**	-0,15								
As	-0,02	-0,15	0,02	0,14	-0,45*	0,05	-0,41							
Pe	0,00	0,42	-0,17	-0,19	0,20	-0,16	0,42	-0,62**						
Di	0,00	-0,15	-0,11	-0,08	0,23	0,27	0,16	-0,22	-0,22					
Ri1	-0,26	-0,36	0,20	0,08	0,05	0,27	-0,34	0,36	-0,11	-0,21				
Ma	-0,18	-0,16	0,01	0,26	0,19	-0,04	-0,03	-0,33	0,36	-0,32	-0,02			
Al	-0,36	0,33	-0,39	-0,32	-0,47*	-0,32	-0,03	0,01	0,15	-0,03	-0,24	-0,13		
Ri2	-0,05	0,00	-0,13	0,06	-0,26	0,05	-0,09	0,36	-0,25	-0,06	-0,02	-0,02	-0,08	

*Significativo ($p<0,05$), ** Significativo ($p<0,01$). D: Densidade. IF: Índice de flotação. DGM: Diâmetro Geométrico médio. P1: peso de 1000 grãos. Dia: Diâmetro. FR: Força de ruptura. Fu: *Fusarium* sp. As: *Aspergillus* sp. Pe: *Penicillium* sp. Di: *Diploidia* sp. Ri: *Rizhopus* sp. Ma: *Macrophomina phaseolina*. Al: *Alternaria* sp. Ri2: *Rizhoctonia* sp.

Aspergillus sp e *Penicillium* sp são considerados fungos xerofílicos, por este motivo contaminam o grão de milho durante o mesmo período, podendo ocorrer competição ou mesmo inibição (PINTO, 1998).

Obtiveram-se também correlações significativas entre a porcentagem dos fungos *Fusarium* sp, *Aspergillus* sp e *Alternaria* sp com o índice de flotação, indicando que quanto maior a quantidade de endosperma macio no grão, maior a contaminação por *Fusarium* sp e menor a contaminação por *Aspergillus* sp e *Alternaria* sp.

Neste estudo foi possível verificar que os fungos *Aspergillus* sp e *Alternaria* sp, ambos considerados fungos xerofílicos, foram isolados em maior percentagem nos grãos com uma maior proporção de endosperma duro, portanto, este tipo de endosperma

não dificultou a infestação do grão por estes dois fungos, provavelmente devido as suas características fisiológicas, já *Fusarium* sp que é considerado um fungo predominantemente de desenvolvimento em campo, teve um maior desenvolvimento em grãos com uma maior proporção de endosperma macio, como era esperado.

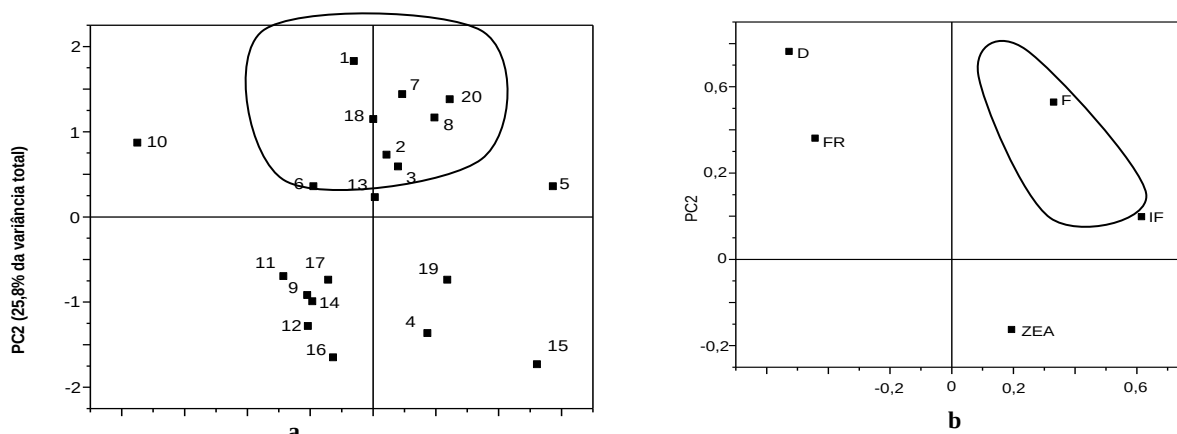
O grão de milho híbrido com uma maior proporção de endosperma macio tem uma maior susceptibilidade à quebra quando comparado àquele que possui uma maior proporção de endosperma vítreo (JAMIN; FLORES, 1998) e também uma maior probabilidade de ataque por insetos, devido à facilidade de penetração no endosperma (BÚTRON et al., 2009).

Segundo Buerstmayr et al. (2003), a resistência genética do grão à infecção por fungos depende de dois fatores: resistência à penetração das hifas no grão e resistência ao desenvolvimento fúngico no endosperma do grão.

Em um estudo realizado por Sampietro et al. (2008) utilizando variedades crioulas e híbridas de milho com origem na Argentina, foi possível verificar que a penetração do fungo no grão é altamente relacionada com as características químicas e mecânicas do pericarpo.

Ono et al. (2006) verificaram que grãos ardidos, ou seja, quebrados correlacionaram-se positivamente ($r=0,30$) com o número de unidades de colônia de *Fusarium* sp, indicando que grãos com danos no pericarpo são uma via de contaminação fúngica.

Foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) com as vinte variedades de milho quanto à relação entre as características densidade, índice de flotação, força de ruptura, contaminação por *Fusarium* sp e contaminação por zearalenona. Os valores foram tabelados, formando uma matriz 20 x 5, que foi utilizada para a PCA. O pré-processamento utilizado foi o autoescalamento (Figura 27).



Através da análise de componentes principais, verificou-se que cerca de 50% das amostras foram agrupadas em torno das características de índice de flotação e contaminação por *Fusarium* sp, como verificado nas amostras destacadas na Figura 29a, indicando que a similaridade destas amostras está relacionada principalmente pela correlação entre essas duas características.

Estes dados indicam que as variedades crioulas de milho com uma maior proporção de endosperma macio podem apresentar uma maior contaminação por *Fusarium* sp, causada provavelmente pela maior facilidade de ataque por insetos em grãos com este tipo de endosperma, já que estes grãos são os mais susceptíveis a pressão e quebra como já verificado na Tabela 21.

Não foi possível obter nenhuma correlação significativa entre a percentagem dos fungos isolados nas variedades em estudo e a composição química dos grãos como verificado na Tabela 22.

Tabela 22. Matriz de correlação entre as características químicas e fúngicas.

	Fu	As	Pen	Di	Ri	Ma	Al	Ri2
Um	0,00	-0,13	0,00	0,07	-0,26	-0,06	0,11	-0,14
PB	0,00	-0,13	-0,18	0,02	0,12	-0,06	-0,03	0,1
L	-0,03	-0,26	0,13	0,03	-0,3	-0,06	0,25	-0,01
C	-0,22	0,18	-0,22	-0,13	0,27	0,05	-0,26	0,12
FAT	-0,04	0,11	-0,16	-0,26	0,07	0,32	0,04	0,05
FB	-0,02	0,08	-0,13	-0,2	0,05	0,2	0,02	0,02
CD	0,05	-0,02	0,18	0,23	-0,01	-0,29	-0,09	-0,06

* Significativo ($p < 0,05$), ** Significativo ($p < 0,01$). Um: Umidade. PB: Proteína bruta. L: Lipídeos. C: Cinzas. FAT: Fibra Alimentar total. FB: Fibra Bruta. CD: Carboidratos disponíveis. Fu: *Fusarium* sp. As: *Aspergillus* sp. Pe: *Penicillium* sp. Di: *Diplodia* sp. Ri: *Rizhopus* sp. Ma: *Macrophomina phaseolina*. Al: *Alternaria* sp. Ri2: *Rizhoctonia* sp.

5.1.11 Análises micotoxicológicas

5.1.11.1 Aflatoxinas totais

Utilizando-se os métodos de detecção ELISA e CCD verificou-se a contaminação por aflatoxinas totais em várias amostras de grãos de milho, conforme apresentado na Tabela 23.

Tabela 23 - Níveis de contaminação por aflatoxinas totais nas amostras de grão de milho analisadas através das metodologias ELISA e CCD.

Variedades	ELISA (ppb)	CCD (ppb)	Variedades	ELISA (ppb)	CCD (ppb)
Nutricional n° 61	ND	ND	Carioca n° 68	1,0	ND
Grande n° 52	2,4	ND	Astequinha sabugo fino n° 70	ND	ND
Palha Roxa n° 72	ND	ND	Vintém n° 56	1,5	ND
Paiol n° 49	1,0	ND	Palha Roxa n° 64	ND	ND
Branco n° 57	2,0	ND	Encantilado n° 59	2,2	ND
Asteca n° 60	1,9	ND	Branco n° 62	2,3	ND
Caiano n° 63	2,6	ND	Amarelo antigo n° 71	2,0	ND
Roxo Índio I n° 06	1,2	ND	Crioulo Oito Carreiras n° 41	ND	ND
Branco para palha n° 69	1,6	ND	Crioulo Pururuca n° 38	ND	ND
Pérola n° 65	ND	ND	Caiano Rajado n° 16	ND	ND

ND: Níveis não detectáveis.

Nenhuma das 20 amostras analisadas pelas duas metodologias estava fora dos padrões preconizados pela Resolução RDC - Anvisa n° 274, de 15 de outubro de 2002, que limita a concentração máxima de aflatoxinas totais nas amostras a 20 ppb.

O nível de recuperação das amostras adicionadas na metodologia CCD ficou em 90% para a aflatoxina B₁, 96,5% para a aflatoxina B₂, 90% para a aflatoxina G₁ e 91% para a aflatoxina G₂. De acordo com a *Commission Regulation* (2006), a faixa aceitável de recuperação é de 60 a 110% para níveis maiores que 100 e menores ou iguais a 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ e de 70 a 120% para níveis maiores a 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de aflatoxinas. Sendo assim, o grau de recuperação da metodologia utilizada esteve dentro do estipulado, demonstrando a eficiência do método utilizado.

Através da técnica ELISA foi possível verificar a contaminação por aflatoxinas em 60% das amostras em níveis de variaram entre 1,0 e 2,6 ppb. Já através da técnica CCD não foram encontrados níveis detectáveis de aflatoxinas.

Das amostras analisadas as que apresentaram uma maior contaminação por aflatoxinas totais foram as variedades V7, V2 e V16 e as que apresentaram uma menor contaminação foram as variedades V1, V3, V10, V12, V14, V18, V19 e V20.

Os resultados apresentados são semelhantes aos apresentados por Caldas et al. (2002), que analisaram 33 amostras de milho em grão do Brasil e não detectaram aflatoxinas totais. Pozzi et al. (1995) analisaram 130 amostras de milho recém colhido e detectaram a contaminação em somente uma delas na concentração de 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. E estão abaixo dos relatados por Machinski Jr. et al. (2001), que detectaram a presença de aflatoxinas em 54,5% das amostras de milho analisadas com níveis que variaram entre 6 e 1600 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Vargas et al. (2001) também analisaram amostras de milho de diferentes regiões do Brasil e observaram contaminação de 38,3% nas amostras com níveis médios de 9,4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

5.1.11.2 Zearalenona

Nutricional nº 61	82,9 i	64 i	Carioca nº 68	ND o	ND j
Grande nº 52	203,8 d	ND j	Astequinha sabugo fino nº 70	79,8 j	640 a
Palha Roxa nº 72	ND o	ND j	Vintém nº 56	398,2 b	320 d
Paio nº 49	333,9 c	640 a	Palha Roxa nº 64	164,9 e	192 f
Branco nº 57	120,0 f	256 e	Encantado nº 59	ND o	448 b
Asteca nº 60	69,8 m	ND j	Branco nº 62	66,9 n	64 i
Caiano nº 63	759,6 a	363 c	Amarelo antigo nº 71	75,5 l	192 f
Roxo Índio I nº 06	105,7 g	170,7 g	Crioulo Oito Carreiras nº 41	ND o	256 e
Branco para palha nº 69	ND o	85,3 h	Crioulo Pururuca nº 38	92,8 h	ND j
Pérola nº 65	ND o	ND j	Caiano Rajado nº 16	ND o	ND j

A análise de contaminação com zearalenona foi realizada em todas as variedades de grãos de milho estudadas pelos métodos de detecção ELISA e CCD. Os resultados dessa análise estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 - Níveis de contaminação por zearalenona nas amostras de grãos de milho analisadas através das metodologias ELISA e CCD.

Amostras com a mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente através do teste de *Tukey* ($p < 0,05$). ND. Níveis não detectáveis.

A média de recuperação do método CCD para a detecção de zearalenona foi de 111%, este valor está dentro do relatado na literatura como requisito para a confiabilidade do método. A *Commission Regulation* (2006) indica como faixa aceitável de recuperação de um método analítico entre 60 e 110% para níveis maiores que 100 e menores ou iguais a $500 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e entre 70 e 120% para níveis maiores que $500 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de zearalenona. Verifica-se, portanto, a eficiência da metodologia empregada.

As concentrações de zearalenona detectadas pelo método CCD variaram entre 64 e 640 ppb, e pelo método ELISA entre 66,9 e 759,3 ppb, sendo obtidas contaminações diferentes nas mesmas amostras pelos dois métodos.

Das amostras analisadas através da metodologia ELISA, 65% encontravam-se contaminadas por esta micotoxina, as maiores contaminações por zearalenona, quantificada através da técnica ELISA foram nas variedades V7, V13 e V4 e as menores contaminações foram apresentadas pelas variedades V3, V9, V10, V10, V11, V15, V18

e V20. Já através da técnica CCD, das amostras analisadas 65% apresentaram contaminação por zearalenona, as maiores contaminações foram verificadas nas variedades V4, V7, V12 e V15 e as menores contaminações foram verificadas nas variedades V2, V3, V6, V10, V11, V19 e V20.

Os resultados encontrados para a contaminação por zearalenona são semelhantes aos apresentados por diversos autores. Briones-Reyes; Gómez-Martínez e Cueva-Rolón (2007), analisando 24 amostras de milho para consumo humano com origem no México, verificaram um índice de contaminação por zearalenona de 70% Marques (2007), analisando 47 amostras de subprodutos de milho para alimentação animal, obteve uma contaminação por zearalenona em 51% das amostras, em concentrações que variaram entre 100 e 5000 ppb. Janardhana; Raveesha e Shetty (1999) analisando a presença de ZEA em 197 amostras de milho encontraram uma ocorrência de 9,6% com concentrações que variaram de 10 a 41 ppb.

O Brasil não possui legislação para zearalenona, entretanto, sugere-se que os valores encontrados podem ser considerados altos, quando comparados com os limites permitidos pelas legislações de alguns países (Tabela 25).

Tabela 25 - Limites permitidos (ppb) de contaminação por zearalenona em alguns países

País	Limite permitido (ppb)	Produto
Uruguai	200	Milho e cevada
Áustria	50	Ração animal
França	200	Cereais
Itália	100	Cereais e subprodutos
Romênia	30	Todos os alimentos
Rússia	1000	Café

Fonte: LAMIC, 2006.

Das amostras analisadas pelo método ELISA, 20% estão acima do estipulado por países como a Uruguai e França e das amostras analisadas através do método CCD, 35% estão acima do estipulado pela legislação destes países.

Das 20 amostras de milho analisadas, doze mostraram-se positivas para zearalenona pelo método ELISA e treze pelo método CCD e quatro mostraram-se

negativas pelos dois métodos utilizados. Na Tabela 26 tem-se uma comparação entre os resultados obtidos pelos dois métodos utilizados.

Tabela 26 - Comparação entre os resultados obtidos pelos dois métodos de estudo.

	CCD negativo	CCD positivo	TOTAL
ELISA negativo	4	3	7
ELISA positivo	3	10	13
TOTAL	7	13	20

Através da análise de *Pearson*, obteve-se uma correlação de $r = 0,41$ para as análises de CCD e ELISA para determinação de zearalenona, este valor não é considerado estatisticamente significativo.

Resultados semelhantes foram citados por Amaral et al. (2006) em análises em subprodutos de milho, comparando-se as técnicas ELISA e CCD.

5.1.12 Relação entre a contaminação por micotoxinas e fungos e as características físicas e químicas

Na Tabela 27 está apresentada a matriz de correlação entre a contaminação por fungos, por aflatoxinas totais, zearalenona e as características físicas e químicas nas variedades em estudo. Como o resultado obtido pelo método CCD para aflatoxinas totais foi zero, ele não foi utilizado na matriz de correlação.

Tabela 27. Matriz de correlação entre as características físicas, químicas e contaminação por micotoxinas dos grãos de milho analisados.

	A (ELISA)	Z(ELISA)	Z(CCD)
A (ELISA)	1,0	0,38	0,15
Z (ELISA)	0,38	1,0	0,41
Z (CCD)	0,15	0,41	1,0
Dpic	-0,32	0,08	-0,2
IF	0,12	0,07	0,15
DGM	0,18	0,13	0,22
P1000	0,3	-0,16	-0,01
Dia	0,17	-0,24	0,06
FR	-0,35	-0,22	-0,08
Um	-0,35	0,00	0,17
PB	0,04	0,17	-0,12
L	-0,08	0,10	0,14
C	0,11	-0,13	0,4
FAT	0,14	0,42	0,4
FB	0,1	0,3	0,32
CD	-0,07	-0,41	-0,35

* Significativo ($p < 0,05$), ** Significativo ($p < 0,01$). D: Densidade. IF: Índice de flotação. DGM: Diâmetro Geométrico médio. P1000: peso de 1000 grãos. Dia: Diâmetro. FR: Força de ruptura. Um: Umidade. PB: Proteína bruta. L: Lipídeos. C: Cinzas. FAT: Fibra alimentar total. FB: Fibra bruta. CD: Carboidratos disponíveis. A (ELISA): Aflatoxina por ELISA. Z (ELISA): Zearalenona (ELISA). Z (CCD): Zearalenona (CCD).

Como observado na Tabela 27 não foi possível verificar nenhuma correlação significativa entre as contaminações por micotoxinas e as características físicas e químicas dos grãos. Na Tabela 28 está apresentada a matriz de correlação entre a contaminação por fungos e micotoxinas.

Tabela 28 - Matriz de correlação entre a contaminação por fungos e micotoxinas nos grãos analisados

	A (ELISA)	Z(ELISA)	Z(CCD)
Fu	-0,26	0,28	0,00
Asp	0,19	-0,08	-0,06
Pe	-0,03	0,02	-0,24
Di	-0,34	0,01	-0,12
Ri	0,34	0,00	0,26
Ma	-0,15	0,00	0,00
Al	0,04	-0,17	-0,25
Ri2	0,23	0,06	0,05

* Significativo ($p < 0,05$), ** Significativo ($p < 0,01$) Fu: *Fusarium* sp. As: *Aspergillus* sp. Pe: *Penicillium* sp. Di: *Diplodia* sp. Ri: *Rizhopus* sp. Ma: *Macrophomina phaseolina* Al: *Alternaria* sp. Ri2: *Rizhoctonia* sp. A (ELISA): Aflatoxina por ELISA. Z (ELISA): Zearalenona (ELISA). Z (CCD): Zearalenona (CCD).

A partir da Tabela 28 percebe-se que a contaminação fúngica não se correlacionou significativamente com a presença das micotoxinas avaliadas. Isto pode ser explicado pelo fato de que a presença do fungo não necessariamente implica na presença da micotoxina, que somente é produzida em condições específicas (HASHIMOTO et al., 2003).

5.2 Farinha de milho *biju* e subprodutos

5.2.1 Caracterização química da farinha de milho *biju*.

Na Tabela 29 são apresentadas as características químicas das amostras de farinhas de milho *biju* derivadas de três variedades em estudo, onde verificou-se que o teor de umidade, de proteína bruta e de cinzas das amostras analisadas variaram significativamente ao nível de 5%.

Tabela 29. Caracterização química das amostras farinha de milho *biju*.

Variedades	Umidade	Proteína Bruta	Lipídeos	Cinzas
Paio n° 49	4,3±0,28 b	8,7±0,4 b	0,72±0,24 a	0,44±0,07 c
Caiano n° 63	6,7±0,77 b	8,7±0,7 b	0,68±0,4 a	0,58±0,02 a
Astequinha sabugo fino n° 70	11,7±1,2 a	9,1±0,3 a	0,41±0,12 a	0,54±0,04 b

Amostras com a mesma letra na coluna não diferem estatisticamente ($p < 0,05$), através do teste de Tukey.

Os resultados apresentados neste estudo são semelhantes aos citados por Callegaro et al. (2005), que analisaram amostras de farinha de milho fina e grossa com origem no estado do Rio Grande do Sul, Br e aos citados por Alessi; Raupp e Gardingo (2003), para amostras de farinha de milho *biju*.

5.2.2 Análises micotoxicológicas na farinha de milho *biju* e nos subprodutos, gérmen e pericarpo.

Na Tabela 30 está apresentada a contaminação por aflatoxinas totais e zearalenona observada nas amostras de farinha de milho *biju* e nos subprodutos analisados.

Tabela 30. Contaminação por aflatoxinas totais e zearalenona na farinha de milho *biju* e nos subprodutos, pericarpo e gérmen, da produção da mesma

Variedades	Afla(ppb)	Zea(ppb)
Paiol nº 49 (Pericarpo)	6,9 c	2555,4 a
Paiol nº 49 (Gérmen)	5,4 d	411 f
Paiol nº 49 (Farinha)	0,6 g	212,3 g
Caiano n º 63 (Pericarpo)	6,0 d	956,8 c
Caiano n º 63 (Gérmen)	4,5 e	515,2 e
Caiano n º 63 (Farinha)	1,4 f	25,2 h
Astequinha sabugo fino nº 70 (Pericarpo)	15 a	1549,8 b
Astequinha sabugo fino nº 70 (Gérmen)	7,7 b	817,7 d
Astequinha sabugo fino nº 70 (Farinha)	4,6 e	210,3 g

Amostras com a mesma letra na coluna não diferem estatisticamente através do teste de Scott Knott ($p < 0,05$). Afla. Aflatoxinas totais, Zea. Zearalenona.

Todas as amostras analisadas apresentaram contaminação por aflatoxinas e zearalenona. Nenhuma das amostras apresentou contaminação por aflatoxinas superior ao estipulado pela legislação (Resolução RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002), que limita a um valor máximo de 20 ppb.

A contaminação por zearalenona e aflatoxinas totais variou entre 25,2 ppb e 2555,4 ppb e entre 0,6 ppb e 15 ppb, respectivamente. As maiores contaminações por estas micotoxinas foram verificadas no pericarpo e as menores contaminações na

farinha de milho *biju*. Estas contaminações não estão relacionadas com a percentagem de fungos isolados nestas variedades.

Resultados semelhantes foram relatados por Solovey (1999), que analisaram 37 amostras de alimentos derivados de milho na Argentina e não verificaram a contaminação por aflatoxinas. Marques (2007) analisou 47 amostras de alimentos a base de milho e verificou que as concentrações de zearalenona variaram entre 100 e 5000 ppb. Amaral et al. (2006) analisaram 123 amostras de produtos derivados de milho no Brasil verificando que apenas 13% apresentaram-se positivas pra aflatoxinas pelo método ELISA.

Em um estudo realizado por Bennett e Richard (1992), foi verificado que a moagem úmida do milho reduz significativamente a concentração de micotoxinas nos subprodutos obtidos. Resultados semelhantes foram apresentados por Bennett et al. (1994), que observou que 22% das micotoxinas eram encontradas na água do processamento do milho, 35% no glúten, 35% no pericarpo e 8% no gérmen, não sendo verificada a contaminação no amido.

Segundo Usfda-Cfsan (2001), os maiores teores de micotoxinas são encontrados no gérmen e no pericarpo, como apresentado no presente estudo. Estes dados indicam que uma separação mecânica do pericarpo pode reduzir significativamente o nível de contaminação por micotoxinas nos subprodutos à base de milho.

6. CONCLUSÕES

Os grãos e a farinha de milho biju das variedades crioulas analisadas apresentaram composição química semelhante à citada na literatura para milho híbrido, das amostras de grãos analisadas as variedades V1, V2, V6, V9, V12, V13, V14 e V18 destacaram-se por possuírem altos teores de proteína e lipídeos.

Os grãos analisados foram classificados como possuidores de endosperma do tipo intermediário e duro. As amostras de grãos após a moagem apresentaram valores razoavelmente altos de diâmetro geométrico médio, sugerindo a utilização destas variedades para a alimentação animal.

Foi verificada ainda que quanto maior o diâmetro dos grãos, menor é a força necessária até a ruptura dos mesmos e que quanto mais duro o endosperma do grão, mais denso ele será e menos susceptível ele estará a ruptura, verificando-se que a força de ruptura do grão depende do tipo de endosperma que este possui.

Foram isolados nas variedades em estudo em ordem de proporcionalidade os fungos, *Penicillium* sp, *Fusarium* sp, *Rhizopus* sp, *Diplodia* sp, *Aspergillus* sp, *Macrophomina phaseolina*, *Alternaria* sp e *Rhizoctonia* sp. Verificou-se que dentre as variedades crioulas analisadas as consideradas mais susceptíveis ao ataque fúngico foram Caiano Rajado nº 16 e Paiol nº 49 e as menos susceptíveis, Palha Roxa nº 64, Astequinha Sabugo fino nº 70 e Branco nº 62.

Nas variedades analisadas quanto maior a quantidade de endosperma macio, maior a percentagem de *Fusarium* sp e menor de *Alternaria* sp e *Aspergillus* sp.

A contaminação por zearalenona nos grãos analisados foi considerada alta quando comparada à legislação de diversos países.

Através da análise de micotoxinas na farinha de milho *biju* e nos subprodutos, verificou-se que todas as amostras apresentaram contaminação por aflatoxinas e zearalenona, sendo as maiores contaminações encontradas no pericarpo e as menores na farinha de milho *biju*, indicando que uma remoção mecânica do pericarpo antes da utilização do grão, limite a contaminação por estas micotoxinas.

7. REFERÊNCIAS

- ABBAS, H.K.; WILLIAMS, W.P.; WINDHAM, G.L.; PRINGLE, H.C.; XIE, W.; SHIER, W.T. Aflatoxin and fumonisin contamination of commercial corn (*Zea mays*) hybrids in Mississippi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington D.C, v. 50, n.18, p.5246–5254, ago-2006.
- ABDULKADAR, A.H.W.; ABSULLA, A.A.; AL-JEDAH, J.H. Ocurrence of aflatoxin in commodities imported into Qatar, 1997-2000. **Food Additives and Contaminants**, Washington D.C, v. 19, n.7, p. 666-670, nov-2002.
- ABREU, L.; CANSI, E.; JURIATTI, C. Avaliação do rendimento sócio-econômico de variedades crioulas e híbridos comerciais de milho na microregião de Chapecó. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v.2, n.1, p.1230 -1233, fev- 2007.
- ALESSI, M. O.; RAUPP, D. S.; GARDINGO, J.R. Caracterização do processamento da farinha de milho biju para o aproveitamento dos subprodutos. **Publicatio UEPG**, Ponta Grossa, Ciências. Exatas Terra, Ciências Agrícolas e Engenharia, v. 9, n.2, p. 31-39, ago-2003.
- ALEXANDER, D. E.; CREECH, R G. Breeding special industrial and nutritional types, In: SPRAGUE, G.F.(ed). **Corn and corn improvement**, Madison, p.363-391, fev-1977.
- ALMEIDA, A.P.; CORREA, B.; MALLOZZI, A.B.; SAWAZAKI, E, VALENTE-SOARES, L.M. Mycoflora and aflatoxina/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, p.321-326, mai-2000.
- ALMEIDA, P.; TARDIN, J, M.; PETERSEN, P. **Conservando a Biodiversidade em ecossistemas cultivados**: Ação comunitária na manutenção de variedades locais no Agreste da Paraíba e no Centro-Sul do Paraná. Disponível em: <http://www.aspta.org.br/publique/media/cultivando_diversidade.pdf>. Acesso em: 01.08.2007.
- 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: 03 set. 2007.
- AMARAL, K.A.S; NASCIMENTO, G.B; SEKIYAMA, B.L, JANEIRO, V; MACHINSKI JR, M. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p.336-342. abr-jun. 2006.
- AMERICAN DIETETICS ASSOCIATION, **Dietary Fiber: An Important Link in the Fight Against Heart Disease**. Disponível em:< www.eatright.org>. Acesso em: 23 out. 2008.
- AMRA, H. Natural occurrence of some mycotoxins in local and imported corn grains (*Zea mays* L.) in Egypt. **Toxicology Letters**, Ireland, v.172, n.1, p.240, out- 2007.

ANDERSON, J. W.; JONES, A. E.; RIDDELL-MASON, S. Ten Different Dietary Fibers Have Significantly Different Effects on Serum and Liver Lipids of Cholesterol-Fed Rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 124, n.10 p. 78-83, out-1994.

ANDERSON, J.W.; HANNA, T. J.; PENG, X.; KRYSCIO, R. J. Whole grain foods and heart disease risk. **American Journal of Clinical Nutrition**, Houston, v. 19, p. 291-299, mar-2000.

ANDRADE, E.T.de.; CORRÊA, P.C.; MARTINS, J.H.; ALVARENGA, E.M. Avaliação de dano mecânico em sementes de feijão por meio de condutividade elétrica. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande v.3, n.1, p.54-60, mar-1999.

A.O.A.C. INTERNATIONAL. **Official Methods of Analysis of International Chemistry Society**. 17th Editions. Washington- USA, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DO MILHO (ABIMILHO). Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/estatistica2.htm>> . Acesso em: 21 set. 2008.

ATEHNKENG, J.; OJIAMBO, P.S.; DONNER, M.; IKOTUN, T.; SIKORA, R.A.; COTTY, P.T.; BANDYOPADHYAY, R. Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* species isolated from maize kernels from three agro-ecological zones in Nigeria. **International Journal of Food Microbiology**, Ireland, v. 122, n.1-2, p. 74-84, fev-2007.

ATUI, M.A; LÁZZARI, F.A. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, out-dez, out-1998.

BAPTISTA, A. S.; HORII, J.; BAPTISTA, A.S. Fatores físico-químicos e biológicos ligados à produção de micotoxinas. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 22, n. 1, p 1-14. mar-2004.

BEACON ANALYTICAL SYSTEMS INC. **Protocolo de análise de kit ELISA para zearalelona**, 2006.

BENNETT, G. A.; RICHARD, J. L. Influence of processing on *Fusarium* mycotoxins in contaminated grains. **Food Technology**, California, v.50, n.5, p.235-238, mar-1996.

BENNETT, G. A.; RICHARD, J. L.; PLATTNER, R. D.; ECKHOFF, S. R. Distribution of fumonisins in food and feed products prepared from contaminated corn. In: JACKSON, L. S.; DE VRIES, J. W.; BULLERMAN, L. B. (Ed.). **Fumonisin in food**. Plenum Press, 1994. p.317-322.

BENSCH, M.J; VAN STADEN, J; RIJKENBERG, F.G. Time and site of inoculation of maize for optimum infection of ears by *Stenocarpella maydis*. **Journal of Phytopathology**, Malden, v. 136, p. 265-269, ago-1992.

BERGERE, J. L. Techniques d'analyse immunochimiques. **Techniques d'analyse et contrôle dans les Industries Agro-Alimentaires**. v. 2, 1991, p. 343-370.

BERTOLINI, A.C.E.; SOUZA, J.E.; NELSON, K.C.; HUBER. Composition and reactivity of A and B type starch granules of normal, partial waxy and waxy wheat. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 80, p. 544-549, out-2003.

BITTENCOURT, A.B.F.; OLIVEIRA, C.A.F.; DILKIN, P.; CORREA, B. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. **Food Control**, Ireland v.16, p. 117–120, mar-2005.

BOBATO, A. **Índice nutricional do nitrogênio: uma ferramenta para o diagnóstico nutricional da cultura do milho**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, ago-2006.

BOCK, R.R.; SHORE, L.S.; SAMBERG, Y.; PERL, S. Death in broiler breeders due to salpingitis: Possible role of zearalenone. **Avian Pathology**, London, v. 15, p.495-502. out-1986.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de produção agropecuária. **Instrução de Serviço SNA 001 de 21 de março de 1991**. Brasília. 1991.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002**. Brasília. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n.27. **Regulamento técnico referente à informação nutricional complementar**. 1998. Disponível em: <<http://anvisa.gov.br>>. Acesso em: 22 out. 2008.

BRIONES-REYES, D.; GÓMEZ-MARTINEZ, L.; CUEVA-ROLÓN, R. Zearalenone contamination in corn for human consumption in the state of Tlaxcala, Mexico. **Food Chemistry**, Ireland, v. 100, p. 693-698, mar-2007.

BROGUERAS, L.M.G. **Micotoxinas**. Disponível em: <www.analizacalidad.com/micotoxinas.htm>. Acesso em: 28 nov. 2008.

BUERSTMAYR, H.; STEINER, B.; HARTL, L.; GRIESSER, M.; ANGERER, N.; LENGAUER, D.; MIEDANER, T.; SCHNEIDER, B.; LEMMENS, M. Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. II. Resistance to fungal penetration and spread. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v.107, p.503–508, out-2003.

BÚTRON, A.; REVILLA, P.; ORDÁS, A.; MALVAR, R.A. Resistance to reduce corn borer damage in maize for bread, in Spain. **Crop Protection**, Ireland, v.28, n.2, p. 1–5, fev-2009.

CALDAS, E.D.; SILVA, S.C.; OLIVEIRA, J.N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v.36, n.3, p. 319- 323, jan- 2002.

CALLEGARO, M.G.K.; DUTRA, C.B.; HUBER, L.S.V.; BECKER, ROSA, C.S.; KUBOTA, E.H.; HECKTHEUR, L.H. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 271-274, nov-2005.

CÂMARA, R.J. **Cultivares crioulas de milho (*Zea mays* L.) em sistema de produção orgânico** – desempenho agrônômico das plantas e composição química das sementes. 2005. 78 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2005.

CAMPOS, A.V. **O reconhecimento de agricultores do município de Anchieta-SC, que cultivam sementes de milho crioulo, como pesquisadores e detentores de direito da propriedade intelectual sobre a melhoria dessas sementes.** 2006. 126p. Dissertação (Mestrado em Educação) - Universidade do Vale do Rio dos Sinos, 2006.

CANCI, I. A. **Sementes Crioulas: construindo soberania: a semente na mão do agricultor.** São Miguel do Oeste. Mclee, 2002.

CANECHIO FILHO, V. **Cultura do milho.** Instituto campineiro de ensino agrícola, São Paulo, 1985.

CARAMORI, P.H. **Zoneamento agrícola do estado do Paraná.** IAPAR, 2003, 76 p.

CARDWELL, K.F.; KING, J.G.; MAZIYA-DIXON, B.; BOSQUE-PEREZ, N.A. Interactions between *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus*, and insect infestation in four maize genotypes in Lowland Africa. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, p. 276–284, mar-2000.

CARVALHO, M. L. M.de; BILIA, D.A. C.; SILVA, W. R. I.da; DE MENEZES J.R. Efeitos do beneficiamento na qualidade de sementes de milho infectadas por *Fusarium moniliforme* sheld. **Scientia agrícola**, Piracicaba, v.50 n.2, jan-1993.

CARVALHO, D.C.O.; ALBINO, L.F.T.; ROSTAGNO, H.S.; OLIVEIRA, J.E.; VARGAS JR, J.G.; TOLEDO, R.S.; COSTA, C.H.R.; PINHEIRO, S.R.F.; SOUZA, R.M. Composição química e energética de amostras de milho submetidas a diferentes temperaturas de secagem e períodos de armazenamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Minas Gerais, v. 33, n.2, p.358-364, abr-2004.

CASA, R.T.; MOREIRA, E.N.; BOGO, A.; SANGOI, L. Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e rendimento de grãos em híbridos de milho submetidos ao aumento na densidade de plantas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.4, p.353-357, jun-2007.

CAST. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. **Council for Agricultural Science and Technology**. n 139, p.199, set-2003.

CAVANAUGH, K.J.; ZEHR, B.E.; NYQUIST, W.E.; HAMAKER, B.R.; CRANE, P.L. Responses to Selection for Endosperm Hardness and Associated Changes in agronomic traits after four cycles of recurrent selection in maize. **Crop Science**, Califórnia, v.35, dez-1995.

CIB - CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA, **Guia do Milho, tecnologia do campo a mesa, junho de 2006.** Disponível em: <www.cib.org.br>. Acesso em: 01set. 2008.

COLOMBE JR, R.A.. Biological actions of mycotoxins. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 76, p. 880–891, 1993.

COMMISSION REGULATION (EC) no 401/2006 of 23 February 2006. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, v. 70, p. 12-34, 2006. Disponível em: < <http://europa.eu.int> >. Acesso em 20/06/08.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO PÚBLICO. **Acompanhamento da safra brasileira**: Grãos, safra 2006/2007, décimo segundo levantamento, setembro 2007, Brasília, Conab, 2007, 24p.

COMUNICAÇÃO SOCIAL. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em: <http://www.ibge.com.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1138&id_pagina=1>. Acesso em: 01 set. 2008.

CORREA, T.B.S.; RODRIGUES, H.R.; VARGAS, E.A.; ASSAD, E.D.; PRADO, G.; COSTA, P.P. Evaluation of the incidence of mycotoxins in Brazilian maize. In: Official Program and AbstractBook of the 10th International IUPAC Symposium on Mycotoxin and Phycotoxin. **Anais...** São Paulo, p134, out-2000.

CORREA, C.E.S.; SHAVER, R.D.; PEREIRA, M.N.; LAUER, J.G.; KOHN, K. Relationship Between Corn Vitreousness and Ruminant In Situ Starch Degradability. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 11, p. 3008-3012, jan-2002.

COSKUN, M. B, YALÇIN, I, ÖZARSLAN, C. Physical properties of sweet corn seed (*Zea mays saccharata* Sturt.). **Journal of Food Engineering**. Ireland, n. 74, p. 523–528, nov-2006.

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I.A. **Importância Econômica** – Plantio, Dez. 2006. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/index.htm>>. Acesso em: 03 set. 2007.

CRUZ, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A. Milho - **Cultivares para 2008/2009: Mais de 300 cultivares de milho são disponibilizadas no mercado de sementes do Brasil para a safra 2008/09**. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/milho/cultivares/index.php>>. Acesso em: 01 jul. 2008.

CUENCA, M. A. G.; NAZÁRIO, C. C.; MANDARINO, D. C. **Características e Evolução da Cultura do Milho no Estado de Alagoas entre 1990 e 2003**. Documentos 83, 2005.

DAHLKE, F.; RIBEIRO, A.M.L.; KESSLER, A.M.; LIMA, A.R. Tamanho da Partícula do Milho e Forma Física da Ração e Seus Efeitos Sobre o Desempenho e Rendimento de Carcaça de Frangos de Corte. **Revista Brasileira de Ciências avícolas**, Campinas, v.3 n.3, mai-2001.

DALPASQUALE, V. A. 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.

DELALIBERA, H.C.; WEIRICH NETO, P.H.; COLET, M.J.; GARBUIO, P.W.; SVERZUT, C.B. Resistência de grãos de milho à ruptura por compressão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.9, p.2493-2497, dez. 2008.

DENTI, E.A.; REIS, E.M. Levantamento de fungos associados às podridões do colmo e quantificação de danos em lavouras de milho do Planalto Médio gaúcho e dos Campos Gerais do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p.585-590, mar-2003.

DILKIN, P.; MALLMANN, C. A.; SANTURIO, J. M.; HICKMANN, J. L. Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de aflatoxinas em híbridos de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 137-141. jan-2000.

DINIZ, S. P. S. S. **Micotoxinas**, 1ªed, Livraria e Editora Rural, Campinas, 2002, 181p.

DOEBLEY, J. F. Molecular evidence for gene flow among Zea species. **BioScience**, v. 40, p. 443-448, 1990.

DUARTE, A.P.; HENRIQUE, D.R.; CORREA, P.C.; PATERNIARI, M.E.A.G.Z. Produtividade, aparência, densidade e susceptibilidade a quebra dos grãos em híbridos de milho safrinha. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.6, n.2, p.174-185, fev-2007.

DUARTE, J.O. **Introdução e Importância Econômica do Milho**, EMBRAPA, 2006 Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/importancia.htm>. Acesso em: 10 jan. 2008.

EATON, D.L.; GROPMAN, J.D. The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance. **Academic Press**, v34, mar-1994.

ECKHOFF, S. R.; PAULSEN, M. R. Maize. In: HENRY, R. J.; KETTLEWELL, P. S. **Cereal grain quality**, Sri Lanka, p. 77-112, 1996.

EIZENDEHER, L.B. **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. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

ELLIS, W.O.; SMITH, J.P.; SIMPSON, B.K.; OLDHAM, J.H. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, v. 30, n.4, p. 403-439, abr-1991.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000, p.360.

FARIAS, A.X.; ROBBS, C.F.; BITTENCOURT, A.M.; ANDERSEN, P.M.; CORREA, T.B.S. 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.

FAVERET FILHO, P.; SIQUEIRA, S.; DAVID, M. R.; CAL, R. C.; MIRANDA, H.; TURANO, C. **Milho**. Informe Setorial nº 8, BNDS, 1996.

FERREIRA, D. F. **Sisvar** - Sistema de Análise Estatística. Lavras: UFLA, 2000.

FLETCHER, S. I.; RICHMOND, P.; SMITH, A. C. An experimental study of twin screw extrusion-cooking of maize *grits*. **Journal of Food Engineering**, Ireland, v. 4, p. 291-312, 1985.

FLORIANI, C.G. **Milho: mais alternativas de uso a cada dia com melhores preços**, Carta Mensal 27, FAEMG, SENAR, 2007.

FNP. **Milho**. Disponível em: < <http://www.fnp.com.br/agricultura/milho/estatisticas.php> >. Acesso em 20 out. 2008.

FREMY, J. M.; CHU, F. S. Immunochemicals methods of analysis for Aflatoxins. *Micotoxins in Dairy Products*. **Elsevier**, p. 97-125, 1989.

GARCIA, J. C.; MATTOSO, M. C.; DUARTE, J. O.; CRUZ, J. C. **Aspectos econômicos da produção e utilização do milho**. Circular Técnica 74, Embrapa, Sete Lagoas, MG, 2006.

GLORIA, E.M.; CIACCO, C.F.; LOPES FILHO, J.F.; ERICSSON, C.; ZOCCHI, S.S. Distribution of aflatoxina contamination in maize samples. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 79-83, jan.mar-2004.

GOLINSKI, P.; GRABARKIEWICZ-SZCZESNA, J. Chemical confirmatory tests for ochratoxin A, citrinin, penicillic acid, sterigmatocystin, and zearalenone performed directly on thin layer chromatographic plates. **Journal of Association Official Analytical Chemistry**, v. 67, n. 6, p. 1108-1110, jun-1984.

GOODMAN, M. História e origem do milho. In PATERNIARI, E. (ed) **Melhoramento e produção de milho no Brasil**. Fundação Cargil, 1978, 650 p.

GOODMAN, T. K. Risk assessment and risk management of mycotoxins in food, In: OLSEN, N.M.M. (Org) *Mycotoxins in food: Detection and control*. **Woodhead Publishing Limited**. 2004.

GONÇALVES, R. A; SANTOS, J. P; TOMÉ, P. H. F; PEREIRA, R. G. F. A; ASCHERI, J. L. M; ABREU, C. M. P. Rendimento e composição química de cultivares de milho em moagem a seco e produção de Grits. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.3, maio/jun., 2003, p.643-650.

GONZALEZ, R.J.; TORRES, R.; DE GREEF, D.de; BONALDO, A.; ROBUTTI, J.; BORRÁS F. Efecto de la dureza del endospermo del maíz sobre las propiedades de hidratación y cocción. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.55, n.4, mai-2005.

GREGG, R. Rough handling kills seeds: seedsmen's Digest, v. 5, n.12, 1954. In: BORBA, C.S.; ANDRADE, R.V.; AZEVEDO, J.T.; OLIVEIRA, A.C. Efeito da debulha mecânica na qualidade de sementes de milho (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 16, n.1, p. 68-70, jan-1994.

GUPTA, R. K; DAS, S. K. Fracture resistance of sunflower seed and kernel to compressive loading. **Journal of Food Engineering**, Ireland, n 46, p. 1-8, nov-2000.

HAN, Y. M.; YANG, F.; ZHOU, A. G. Supplemental phytases of microbial and cereal source improve dietary phytate phosphorus utilization by pigs from weaning through finishing. **Journal of Analytical Science**, Japan, v.75, n.4, p.1017-1025, abr-1997.

HASHIMOTO, E. H.; SANTOS, M.; ONO, E. Y. S.; HAYASHI, C.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; HIROOKA, E. Y. Bromatologia e contaminação com fumonisina e aflatoxina em rações utilizadas na piscicultura da região de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 123-132, jan.jun- 2003.

HEFLE, S.L. Immunoassay fundamentals. **Food Technol.**, v. 49, n. 2, p. 102-107, 1995.

IBGE. **Produção de milho.** Disponível em: <http://www.ibge.com.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1138&id_pagina=1>. Acesso em: 01 set.2008.

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

INTA BALCARCE, **La calidad del grano.** Disponível em: <<http://www.a-campo.com.ar/espanol/maiz/maiz3.htm>> . Acesso em: 06 out. 2008.

ISTA (International Seed Testing Association), **Handbook or Seed Health Testing**, Zurich, Switzerland, 1981.

JAMIN, F. F.; FLORES, R. A. Effect of additional separation and grinding on the chemical and physical properties of selected corn dry-milled streams. **Cereal Chemistry**, California, v. 75, p. 166–170, mar-1998.

JANARDHANA, G.R K.; RAVEESHA, A.; SHEKAR SHETTY, H. Mycotoxin Contamination of Maize Grains Grown in Karnataka (Índia). **Food and Chemical Toxicology**, Ireland, v. 37, n.8, p. 863-868, ago-1999.

JOUANY, J.P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Ireland, v.137, n. 3-4, p. 342–362, out-2007.

KAWASHIMA, L. M.; VALENTE-SOARES, L. M. Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, acratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.3, p. 516-521, jul-set- 2006.

KIBUUKA, G. K. **Efeito da umidade e tempo de condicionamento nas características tecnológicas do milho branco** var. BR 451. 1993. 286p Tese (Doutorado em Agronomia), Campinas: UNICAMP, 1993.

KIRLEIS, A. W.; SREOSHINE, R. L. Effects of Hardness and Drying Air Temperature on Breakage Susceptibility and Dry-Milling Characteristics of Yellow Dent Corn. **Cereal Chemistry**, California, v.67, n.6, p.523-528, jul-1990.

KNIEP, K. R.; MASON, S. C. Kernel breakage and density of normal and opaque-2 maize grain as influenced by irrigation and nitrogen. **Crop Science**, Ireland, v. 29, p. 158-163, jan-1989.

LAZZARI, F. Rações e micotoxinas. In: SCUSSEL, V. M. (Org) **Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem de grãos**. Florianópolis, VMS, 2000, 382p.

LEAL, P.C.; CANTANHEDE, K.L.; SILVA, L.M.; BEZERRA, G.F.B.; VIANA, G.M.C.; NASCIMENTO, M.D.S.B. Micotoxinas do Fusarium e seu Potencial Carcinogênico. **NewsLab**, ed. 70, 2005.

LEESON, S.; GONZALO, J.D.G.; SUMMERS, J.D. **Poultry disorders and mycotoxins**. p. 350, 1995.

LEFORD, D.R.; RUSSEL, W.A. Evaluation of Physical Grain Quality in the BS17 and BSI(HS)C1 Synthetics of Maize. **Crop Science**. Ireland, v. 25, jul-ago-1985.

LEGISLAÇÃO sobre micotoxinas. Disponível em: <<http://www.lamic.ufsm.br/legislacao.html>>. Acesso em: 08 fev. 2008.

LEONEL, F.P. **Fibra na alimentação de ruminantes**. Serrana Nutrição Animal, Boletim Técnico. Março-abril, 86 ed, 2008.

LOZANO-ALEJO, N.; CARRILLO, G.V.; PIXLEY, K.; PALACIOS-ROJAS, N. Physical properties and carotenoid content of maize kernels and its nixtamalized snacks. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.8, n.3 p. 385–389, mar-2007.

MACHADO, A. T.; MAGNAVACA, R. **Estresse ambiental: O milho em perspectiva**. Rio de Janeiro, AS-PTA, 1991. 43p.

MACHINSKI JR, M.; SOARES, L. M. V.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J. L.; BORTOLLETO, N. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalelone in Brazilian corn cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 81,n.3, p. 1001-1007, jul-set-2001.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. A. M.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. **Fisiologia do milho**. Circular técnica 22, Embrapa, Sete Lagoas, 2002.

MANTOVANI, B.H.M.; FONTES, R.A. **Secagem e armazenamento de milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1989. 35 p.

MARQUES, P, J, L. **Avaliação de aflatoxinas e zearalenona em quirera(canjiquinha de milho) na região dos Campos Gerais**. 2007. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2007.

MARTINEZ-HERRERA, M.L.; LACHANCE, P.A Corn (Zea mays) kernel hardness as an index of the alkaline cooking time for tortilla preparation. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 44, n.2, p. 377–380, fev-1978.

MARTINEZ, B.F.; GUIRAGOSSIAN, V. Comparación de métodos de dureza en sorgo y su relación con los parámetros de tratamiento alcalino y su calidad de tortillas. In: REUNIÓN NACIONAL SOBRE SORGO, Jal Mexico, 1989, Anais... In SALINAS, Y.M.; MARTINEZ, F.B.; GOMEZ, J.H. Comparación de métodos para medir la dureza del maíz (Zea mays L.). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 42, n. 1, jan-1992.

MAZZUCO, H; LORINI, I; BRUM, P. A. R; ZANOTTO, D. L; BARIONI JR, W; AVILA, V.S. Composição Química e Energética do Milho com Diversos Níveis de Umidade na Colheita e Diferentes Temperaturas de Secagem para Frangos de Corte, **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v.31, n.6, p.2216-2220, jun-2002.

MENDES, W.S. **Valor nutritivo do milho, sorgo e soja submetidos ou não a diferentes processamentos térmicos para suínos em crescimento**. 2002. 49p. Dissertação (Mestrado em Veterinária). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

MENEGUETTI, G.A.; GIRARDI, J.L.; REGINATTO, J.C. Milho crioulo: tecnologia viável e sustentável. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, Porto Alegre, v.3, n.1, jan-mar-2002.

MESTRES, C.; MATENCIO, F.; LOUIS-ALEXANDRE, A. Mechanical behavior of corn kernels: development of a laboratory friability test that can predict milling behavior. **Cereal Chemistry**, California, v. 72, n.6, p. 652–657, jun-1995.

MILLER, J.D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal Stored Product Research**, Ireland, v. 31, p 1-15, 1995.

MIRANDA FILHO, J.B.; VIÉGAS, G.P. Milho híbrido. In: PATERNIARI, E.; VIÉGAS, G.P. (Eds) **Melhoramento e produção do milho**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, v.1, 1987, p.277-326.

MIRANDA FILHO, J.B.; NASS, L.L. Hibridação no melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S. de; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas**. São Paulo, 2001, 603-627p.

MIRANDA, G.V.; SOUZA, L.V.; SANTOS, I.C.; MENDES, F.F. Resgate de variedades crioulas de milho na região de Viçosa-MG. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v.2, n.1, p.1145-1148, jan-2007.

MOREIRA, S.M.C.; CHAVES, M.A.; OLIVEIRA, L.M. Comparação da eficiência de líquidos na determinação da massa específica aparente de grãos agrícolas. **Revista Brasileira de Armazenagem**, Viçosa, v. 9 e 10, n. 1 e 2, p. 22-24, 1984-1985.

NARVAES-GONZALEZ, E. D.; FIGUEROA-CARDENAS, J. D.; TABA, S.; TOSTADO, E. C.; PENICHE, R. A. M.; SANCHEZ, F. R. Relationships between the microstructure, physical features, and chemical composition of different maize accessions from Latin America. **Cereal Chemistry**, Califórnia, v. 83, n. 6, p. 595- 604, jun-2006.

NARVÁEZ-GONZÁLEZ, E.D.; CÁRDENAS, J.D.F.; TABA, S.; TOSTADO, E.C.; PENICHE, R.A.M. Efecto del tamaño del granulo de almidón de maíz en sus propiedades térmicas y de pastificado. **Revista Fitotecnia Mexicana**, Mexico, v.30, n 3, p. 267-177, abr-2007.

NASS, L.L.; ARAÚJO, P. M. Caracterização e avaliação de populações de milho crioulo. **Scientia Agrícola**, Viçosa, v.59, n.3, p.589-593, mar-2002.

NIR, I.; MELCION, J.P.; PICARD, M. Effect of particle size of sorghum grains on feed intake and performance of young broilers. **Poultry Science**, Wisconsin, v. 69, p.2177-2184, 1990.

OGLIARI, J.B.; ALVES, A.C.; KIST, V.; FONSECA, J.A.; BALBINOT, A. Análise da diversidade genética de variedades locais de milho. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v.2, n.1, p. 191-195, jan-2007.

OLIVEIRA, M. S.; PRADO, G.; JUNQUEIRA, R. G. Comparação das técnicas de cromatografia em camada delgada e ELISA na quantificação de aflatoxinas em amostras de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 3, set-dez-2000.

ONO, E.Y.S.; BIAZON, L.; SILVA, M.; VIZONI, E.; SUGIURA, Y.; UENO, Y.; Hirooka, E.Y. Fumonisin in corn: Correlation with Fusarium sp. count, damaged kernels, protein and lipid content. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.49, p.63-71, fev- 2006.

PADOVAN, M.P.; LEONAL, L.A.K.; CESAR, M.N.Z.; OLIVEIRA, F.L.; MARIANI, M.A.; DAINESI, L.C. Resgate de variedades de milho e avaliação em diferentes ecoregiões de Mato Grosso do Sul, submetidas a manejo orgânico. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v.2, n.1, p. 355-359, jan-2007.

PAES, M. C. D. **Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho**, Circular Técnica 75, Embrapa, Sete Lagoas, MG, 2006.

PAES, M.C.D. **Manipulação da composição química do milho: impacto na indústria e na saúde humana**. 2008. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/milho/index.htm>. Acesso em: 11 dez.2008.

PANTALEÓN, F.I.G.; SALINAS, R.J; EGEA, J.S.; VILLAREJO, J.M.; CRESPO, F.L. **Mohos en los alimentos**. Cordoba, Acta-a, Tipografia Catolica, 1988, 88p.

PAYNE, G.A. Aflatoxins in maize. **Critical Review of Plant Science**, v. 10, p. 423–440, 1992.

PATERNIANI, E.; NASS, L. L.; SANTOS, M. X. O valor dos recursos genéticos de milho para o Brasil: uma abordagem histórica da utilização do germoplasma. In: UDRY, C.W.; DUARTE, W. (Org.) **Uma história brasileira do milho: o valor dos recursos genéticos**. Brasília, Paralelo, 15, 2000. p.11-41.

PAULUS, G.; MACHADO NETO, D. P. Produção de semente própria de milho variedade. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, Santa Maria, v.2, n.1, jan.mar-2001.

PAULSEN, M. R.; HILL, L. D. Corn quality factors affecting dry milling performance. **Journal of Agricultural Engineering Research**, v. 31, p. 255-263, fev-1985.

PEREIRA, M. L.; TOLEDO, M. C. F. Micotoxinas: Impacto na saúde humana e animal e sua detecção pelo método ELISA. **Caderno Técnico Escola Veterinária**, n. 13, p.5-27. ago-1995.

PEPLINSKI, A.J.; PAULSEN, M.R.; ANDERSON, R.A.; KWOLEK, W.F. Physical, Chemical, and Dry-Milling Characteristics of Corn Hybrids from Various Genotypes. **Cereal Chemistry**, Califórnia, v. 66, n.2, p.117-120, fev-1989.

PINHO, R.G.V.; CARVALHO, G.S.; RODRIGUES, V.N.; PEREIRA, J. Características físicas e químicas de cultivares de milho para a produção de minimilho. **Ciências e agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n.6, p.1419-1425, nov.dez-2003.

PINTO, N.F.J.A. **Patologia de sementes de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, CNPMS, Circular técnica, 29, 1998, p 44.

PINTO, N. F. J. A. **Importância Econômica – Doenças**, Dez. 2006. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/index.htm>> Acesso em: 03 set. 2007.

POMERANZ, Y.; MARTIN, C.R.; TRAYLOR, D.D.; LAI, F.S. Corn hardness determination. **Cereal Chemistry**, California, v. 61, n.2, p.147-150, fev-1984.

POMERANZ, Y.; CZUCHAJOWSKA, Z. Comparison of methods for determination of hardness and breakage susceptibility of commercial dried corn. **Cereal Chemistry**, Califórnia, v. 63, n.1, p.39-43, jan-1986.

POZZA, P.C.; POZZA, M.S.S.; RICAR, S.; OLIVEIRA, F.G.; GASPAROTTO, E.S.; SCHLICKMANN, F. Avaliação da moagem e granulometria do milho e consumo de energia no processamento em moinhos de martelos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.1, p 235-238, jan.fev-2005.

POZZI, C. R.; CORREA, B.; GAMBELE, W.; PAULA, C. R.; CHACON-RECHE, N. O.; MEIRELLES, M. C. Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxin occurrence. **Food additives and contaminants**, Washington, D.C, v. 12, n. 3, p. 312-319, mar-1995.

PRADO, G. Densitometria em camada delgada para análise de aflatoxinas, In: SCUSSEL, V. M. (Org) **Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem de grãos**. Florianópolis, VMS, 2000, 382p.

PRZYBYKSKI, W. Formation of aflatoxin derivatives on thin layer chromatographic plates. **Journal of Association Official Analytical Chemistry**, v, 58, n.1, p.163- 164, jan-1975.

REDDY, C.V. Aflatoxins in feed: an enemy to poultry producers in the tropics. **World Poultry**, v. 8, p. 19-20, ago-1992.

REIS, E.M.; CASA, R.T. Ciclos biológicos e epidemiologia: *Aspergillus*, *Penicilium*, *Diplodia* e *Fusarium*. In: MOLIN, R.; VALENTINI, M.L. (Org). **Simpósio sobre micotoxinas em grãos**, 1999, Ponta Grossa. Artigos...São Paulo, Fundação Cargill/Fundação ABC, 1999, p. 9-20.

REVISTA RURAL. Milho: **A engenharia do híbrido**. v.92, 2005. Disponível em: <http://www.revistarural.com.br/Edicoes/2005/artigos/rev92_milho.htm>. Acesso em: 01 ago. 2007.

RIBEIRO, S.A.L.; CAVALCANTI, M.A.Q.; FERNANDES, M.J.S.; LIMA, D.M.M. Fungos filamentosos isolados de produtos derivados do milho comercializados em Recife, Pernambuco. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.26, n.2, p.223-229, jun-2003.

RODRIGUEZ - AMAYA, D. B. Validação de metodología, *In*: SCUSSEL, V. M. (Org) **Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem de grãos**. Florianópolis, VMS, 2000, 382p.

RODRIGUEZ - AMAYA, D. B.; SABINO, M. Mycotoxin Research in Brazil: The last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 1-11, jan-2002.

RODRIGUES, P. B.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; GOMEZ, P. C.; BARBOZA, W. A.; SANTANA, R. T. Valores Energéticos do Milheto, do Milho e Subprodutos do Milho, Determinados com Frangos de Corte e Galos Adultos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 1767-1778, jul-2001.

ROMER LABS METHODS. **Protocolo de análise de kit ELISA para aflatoxinas totais 1/20**. Sisngapore, 2004.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**. Composição de alimentos e exigências nutricionais. 186p. Viçosa: UFV. 2005.

SABINO, M.; INOMATA, E. I.; LAMARCO, L. C. A. Variação dos níveis de aflatoxina B1 em pasta de amendoim e paçoca consumidas no estado de São Paulo. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 42, n. 1 e 2, p. 39-44, fev-1982.

SABINO, M.; LAMARDO, L.C.A.; INOMATA, E.I.; ICHIKAWA, A.H.; GIANNATTASIO, C.M.P. Ocorrência de aflatoxina B1 em produtos alimentícios e rações animais, consumidos no Estado de São Paulo e várias regiões do Brasil, no período de 1980 a 1987. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 48, n. 1 e 2, p. 81-85, mar-1988.

SABINO, M.; PRADO, G.; INOMATA, E. I.; PEDROSO, M. O.; GARCIA, R. V. Natural occurrence of aflatoxins in maize in Brazil Part II. **Food Additives and Contaminants**, Washington D.C, v. 6, n.3, p. 327-331, mar-1989.

SABINO, M. Ocorrência e métodos analíticos para a determinação de micotoxinas em grãos e rações. *In*: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MICOTOXINAS E MICOTOXICOSES EM AVES, 1995, Curitiba, **Anais...**Curitiba, FACTA, 1995. p. 35-47.

SALEEMULLAH, A.I.; IQTIDAR, A.K.; HAMIDULLAH, S. Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts. **Food Chemistry**, Ireland, v. 98, n.4, p. 699-703, jun-2006.

SALINAS, Y.M.; MARTINEZ, F.B.; GOMEZ, J.H. Comparación de métodos para medir la dureza del maíz (*Zea mays* L.). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 42, n.1, jan-1992.

SALINAS, Y, M.; ARELANNO, J.L.; MARTINEZ, F.B. Propiedades físicas, químicas y correlaciones de maíces híbridos precoces para valles altos, **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 42, n. 2, fev-1992.

SAMPIETRO, D.A.; VATTUONE, M.A.; PRESELLO, D.A.; FAUGUEL, C.M.; CATALÁN, C.A.M. The pericarp and its surface wax layer in maize kernels as resistance factors to fumonisin accumulation by *Fusarium verticillioides*, **Crop Protection**, (2008). Disponível em: < [doi:10.1016/j.jfoodmicro.2007.11.062](https://doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2007.11.062) >. Acesso em 02 jan. 2008.

SANDHU, K. S.; SINGH, N.; MALHI, N. S. Some properties of corn grains and their flours I: Physicochemical, functional and chapati-making properties of flours **Food Chemistry**, Ireland, v.101, n. 3, p. 938-946, mar-2007.

SANGALETTI, V. Resgate da produção e do uso de sementes de milho crioulo. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v.2, n.1, p. 276-279, jan-2007.

SANTURIO, J. M, Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. **Revista Brasileira de Ciencias Avícolas**, Campinas, v. 2, n.1, fev-2000.

SARGEANT, K.; O'KELLY, J.; CARNAGHAN, R.B.A.; ALLCROFT, R. The assay of a toxic principle in certain groundnut meals. **Veterinary Record** , London, v. 73, 1219-23, 1961.

SAWAZAKI, E.; PATERNIANI, M.E.A.G.Z. Evolução dos cultivares de milho no Brasil. In: GALVÃO, J.C.C.; MIRANDA, G.V. **Tecnologias de produção do milho**. 20.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, v.1, 2004, p.13-53.

SCUSSEL, V.M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. p. 19-22.

SCUSSEL, V.M. Vantagens e Desvantagens de TLC, HPTLC e HPLC, In: SCUSSEL, V. M. (Org) **Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem de grãos**. Florianópolis, VMS, 2000, 382p.

SERRA, R. **Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A** **Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A**. 2005. 350p. Tese (Doutorado em Engenharia química e biológica). Escola de Engenharia, Universidade do Minho. 2005.

SILVA, S.D.A.; BEVILAQUA, G.A.P.; AIRES, R.F.; MACHADO, E.B. **Guia para produção de sementes de milho variedade na propriedade de base familiar**. Documentos 146. EMBRAPA, Pelotas, 2005.

SILVA, L.P; CIOCCA, M.L.S; FURLONG, E.B. **Avaliação do método enzimico-gravimétrico AOAC 985.29**, para a determinação da fibra alimentar em grãos crus de aveia e milho. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.53, n.4, Caracas. 2003.

SILVA, O. C.; SCHIPANSKI, C. A. **Manual de identificação e manejo das doenças do milho**. 1^a ed, Fundação ABC, Castro, 2006.

SILVA, C.S.; COUTO, H.P.; FERREIRA, R.A.; FONSECA, J.B.; GOMES, A.V.C.; SOARES, R.T.R.N. Valores nutricionais de milhos de diferentes qualidades para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Santa Maria, v.37, n.5, p.883-889, mai-2008.

SIMEPAR. **Dados climatológicos do estado do Paraná**. Disponível em: <www.simepar.br> . Acesso em: 02.jan.2009.

SINGH, K. K; GOSWAMI, T. K. Mechanical Properties of Cumin Seed (*Cuminum cyminum* Linn.) under Compressive Loading. **Journal of Food Engineering**, London, v. 36, n.3, p 311-321, mai-1998.

SOARES, A.C.; DE MACHADO, A.T.; VON DER WEID, J.M. **Milho Crioulo: conservação e uso da biodiversidade**. Rio de Janeiro, AS-PTA:1998, p. 185.

SOARES, L. M. V.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Survey of aflatoxins, ocratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of Association Official Analytical Chemistry**, v. 72, n. 1, p. 22-26, jan-1989.

SOLOVEY, M.M.; SOMOZA, C.; CANO, G.; PACIN, A.; RESNIK, S. A survey of fumonisins, deoxyvalenol, zearalenone and aflatoxins contamination in corn-based food products in Argentina. **Food and Additives Contaminants**, Washington D.C, v. 16, n.8, p. 325-329, ago-1999.

SOUZA, J.C. Principais aspectos sobre as pragas do milho em plantios direto e convencional. **Centro Tecnológico do Sul de Minas – CTSM**. UFLA. 2005.

TANAKA, M. A. S.; MAEDA, J. A.; PLAZAS, I. H. A. Z. Microflora fúngica de sementes de milho em ambientes de armazenamento. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.58, n.3, p.501-508, jul.set- 2001.

TEIXEIRA, M.M.; MARTYN, P.J.; HARA, T.; CUNHA, J.P.A.R. Propriedades físicas e aerodinâmicas aplicadas ao projeto de máquinas de limpeza para grãos de milho. **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, v.11, n.52, p.1-4, jan.dez- 2003.

TENUTA, A. **Identifying Corn Ear Molds**. Field Crop Plant Pathologist, Disponível em: <<http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/field/news/croppest/2006/17cpo06a1.htm>>. Acesso em: 20. dez. 2008.

THOMPSON, D.L.; GOODMAN, M.M. Increasing Kernel Density for Two Inbred Lines of Maize. **Crop Science**, Ireland, v.46, n.5, mai-2006.

TOLLENAAR, M.; WU, J. Yield improvement in temperate maize is attributable to greater stress tolerance. **Crop Science**, Ireland, v.39, n.6, p.1597-1604, jun-1999.

TRINDADE, C.C. **Sementes crioulas e transgenicos, uma reflexão sobre sua relação com as comunidades tradicionais**, 2006. Disponível em: <www.conpedi.org/manaus/arquivos/anais/manaus/estado_dir_povos_carina_carreira_trindade.pdf>. Acesso em: 26 set. 2008.

URRACA, J.L.; MARAZUEA, M.D.; MORENO-BONDI, M.C. Analysis for zearalenone and α -zearalenol in cereals and swine feed using accelerated solvent extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chemica Acta**, v. 524, n.1-2, p. 175-183, 2004.

USFDA-CFSAN . **Background paper in support of fumonisins levels in corn and corn products intended for human consumption**. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fumongu3>> Acesso em: 02 jan. 2008.

VARGAS, E.A.; PREIS, R.A.; CASTRO, L.; SILVA, C.M.G. Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 e G2 zearalenone and fumonisin in Brazilian corn. **Food and Additives Contaminants**, Ireland, v. 18, n.11, p. 981-986, nov-2001.

VELOSO, J.A.F.; MEDEIROS, S.L.S.; AROUCA, C.L.C.; RODRIGUEZ, N.M.; SALIBA, E.O.S.; OLIVEIRA, S.G. Composição química, avaliação físico-química e nutricional e efeito da expansão do milho e do farelo de soja para suínos em crescimento. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Minas Gerais, v.57, n.5, p.623-633, mai-2005.

VERMA, R. C.; PRASSAD, S. Mechanical and thermal properties of corn. **Journal of Food Science and Technology**, Chester, v. 37, p. 500–505, dez-2000.

VIEIRA, L.M. **Síntese anual da agricultura de Santa Catarina 2005 – 2006**, Epagri/Cepa, 2006.

WATSON, A.S.; RAMSTAD, PE. **Corn: Chemistry end technology**. American Association of Cereal Chemistry, 1987, p 150-151.

WILHELM, E. P.; MULLEN, R. E.; KEELING, P. L.; SINGLETARY, G. W. Heat stress during grain filling in maize: effects on kernel growth and metabolism. **Crop Science**. Ireland, v. 39, n.6, p. 1733-1741, jun-1999.

WITTE, C. HOOSER, S. **The Presence, Effect, and Diagnosis of Zearalenone in Dairy Cattle**. Boletim Científico No. 48. Disponível em: <www.micotoxinas.com.br>. Acesso em: 15 out. 2008.

WOGAN, G. N.; BUSBY, W. F. Jr. Naturally occurring carcinogens. In I. E. LIENER (Ed.), **Toxic Constituents of Plant Feedstuffs**. New York: **Academic Press Inc**, 1980.

WOLOSHUK, C.P. **Mycotoxins and Mycotoxin Test Kits**. Disponível em <<http://www.ces.purdue.edu/extmedia/BP/BP-47.html>>, Acesso em: 10.set.2008.

ZANOTTO, D.L.; BELLAVER, C. **Método de determinação da granulometria de ingredientes para uso em rações de suínos e aves**. Comunicado técnico 125, Embrapa-Cnpa, 1996, p. 1-5.

ZERINGUE, H.J.; BROWN, R.L.; NEUCERE, J.N. Relationships between C6-C12 alkanal and alkenal volatile contents and resistance of maize genotypes to *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. Washington DC, v. 44, n.2, p. 403-407, fev-1996.

ZEVEN, A.C. Traditional maintenance breeding of landraces: 2. Practical and theoretical considerations on maintenance of variation of landraces by farmers and gardeners. **Euphytica**, Netherlands.v. 123, n.2, p.147–158, fev-2002.

ZHANG, W.; HOSENEY, R. C. Factors affecting expansion of corn meals with poor and good expansion properties. **Cereal Chemistry**. California, v. 75, n. 5, p. 639-643, mai-1998.