

DIANA PARIS TRAVAGLIA

CRESCIMENTO DE *Aspergillus flavus* E PRODUÇÃO DE AFLATOXINA
EM GRÃOS DE MILHO ARMAZENADOS SOB DIFERENTES
TEMPERATURAS

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Agrícola,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

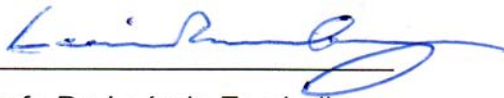
VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

DIANA PARIS TRAVAGLIA

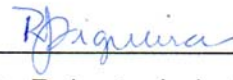
CRESCIMENTO DE *Aspergillus flavus* E PRODUÇÃO DE AFLATOXINA
EM GRÃOS DE MILHO ARMAZENADOS SOB DIFERENTES
TEMPERATURAS

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Agrícola,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

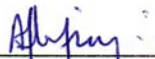
APROVADA; 28 de fevereiro de 2011.



Prof.: Dr. Laércio Zambolim



Dr^a.: Roberta J. de Almeida Rigueira



Prof.: Dr.: Adílio Flauzino de Lacerda Filho
(Orientador)

Dedico,

aos meus amados pais, Regina e Chicco,

ao meu grande irmão, Rafael,

e aos meus queridos familiares!

"... Pra se entender
Tem que se achar
Que a vida não é só isso que se vê
É um pouco mais
Que os olhos não conseguem perceber
E as mãos não ousam tocar
E os pés recusam pisar..."
(Paulinho da Viola)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua benção.

Aos meus queridos pais, pelo apoio e incentivo aos prazeres da ciência.

Ao meu grande irmão e amigo, Rafael, por ser tudo o que ele é para mim.

Ao Elton, por toda força, incentivo, ajuda e alegria!

Aos meus familiares, por serem exemplos de honestidade, união, determinação e luta.

Ao meu primo Dr. Marcelo Piassi, Geneticista da Brasil Foods, pelos momentos de grande ajuda e pelos ensinamentos.

Às amigas Natália e Thaís, pela amizade, ajuda ao escrever e pelo apoio constante!!!

Às amigas Marcela e Marcelle, pela amizade!

À amiga Jussara, pelos estudos do SAS, pelas conversas, pelo carinho nos momentos de angústia e ansiedade, e pela grande amizade.

Aos amigos da turma ENG-670, por tantos momentos de estudo, ensinamentos e alegria!!!

Às amigas conquistadas, Roberta e Svetlana, por toda ajuda com o experimento, incentivo e pelo imenso carinho.

À turma do Laboratório de Grãos, por tantos momentos de alegria e ajuda, e pelas amizades conquistadas!!!

À turma do Laboratório de Proteção de Plantas, pela grande ajuda com os fungos!

Aos amigos de grupo da turma de ZOO 642, por todo carinho e vontade de me ajudar com os estudos dessa disciplina.

Aos estagiários, pelo carinho ao me ajudar.

Aos funcionários, Catitu, Édson e Sérgio, pela ajuda sempre que necessária.

Ao meu orientador, Adílio Flauzino de Lacerda Filho, pelos ensinamentos.

Ao professor Laércio Zambolim, por toda atenção, ajuda e conhecimentos.

Ao professor Luiz Fernando Teixeira Albino, por toda atenção e conhecimentos.

Ao professor José Benício Paes Chaves, pelos conhecimentos.

Aos demais professores, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao prezado Josué Rosmaninho, Gerente Técnico Comercial do Romer Labs do Brasil, pela grande ajuda!

À empresa Cool Seed – Resfriamento Artificial de Sementes e Grãos, pelo financiamento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

À Universidade Federal de Viçosa e em particular aos Departamentos de Engenharia Agrícola e de Fitopatologia, pela oportunidade de realizar o curso.

A todas as pessoas que indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada!

BIOGRAFIA

DIANA PARIS TRAVAGLIA, filha de Alcides Francisco Travaglia e de Regina Maria Paris Travaglia, nasceu em Castelo, Espírito Santo, aos 17 dias do mês de abril de 1985.

Cursou o ensino médio no Colégio Expoente de Castelo, em Castelo-ES, no período de 2000 a 2002.

Iniciou o curso de Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, em 2004, e colou grau em janeiro de 2009.

Em março de 2009, iniciou o mestrado em Engenharia Agrícola, na área de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas, na UFV, defendendo dissertação em 28 de fevereiro de 2011.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Milho.....	3
2.2. Armazenamento	3
2.3. Fungo	5
2.3.1. Atividade de água (a_w), teor de água de equilíbrio e umidade relativa do ar	6
2.3.2. Crescimento de Fungos e Produção de Micotoxinas.....	7
2.3.2.1. <i>Aspergillus flavus</i>	8
2.3.2.2. Micotoxinas.....	9
2.4. Aflatoxinas	11
2.4.1. Métodos Analíticos para Determinação de Micotoxinas.....	12
2.5. Legislação	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Análises estatísticas.....	15
3.2. Isolado utilizado	15
3.3. Grãos de milho	15
3.3.1. Análise de micotoxina	15
3.4. Colonização em meio de cultura artificial.....	16
3.4.1. Meio de cultura artificial	16
3.4.2. Inoculação em meio de cultura.....	16
3.4.3. Incubação do meio de cultura	18
3.4.4. Determinação do crescimento da colônia.....	19
3.5. Colonização em grãos de milho	19
3.5.1. Preparo dos grãos de milho	19

3.5.2. Inoculação dos grãos de milho	20
3.5.3. Incubação dos grãos de milho	22
3.5.4. Avaliação do crescimento fúngico	22
3.5.5. Determinação do teor de água ao final do período de incubação	23
3.6. Avaliação de aflatoxina no meio de cultura artificial e nos grãos de milho	23
3.6.1. Análise quantitativa de aflatoxina no meio YES	23
3.6.2. Análise quantitativa de aflatoxina no milho	25
4. RESULTADOS	27
4.1. Crescimento de <i>A. flavus</i> acompanhado em intervalos regulares de 24h, durante 14 dias, no meio YES	27
4.2. Efeito da temperatura no crescimento de <i>A. flavus</i> no meio YES ...	27
4.3. Determinação da produção de aflatoxina total (B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂) no meio YES	28
4.4. Determinação do teor de água dos grãos de milho	30
4.5. Avaliação do crescimento fúngico nos grãos de milho	31
4.6. Determinação da aflatoxina total (B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂) nos grãos de milho	33
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÕES	38
7. BIBLIOGRAFIA	39
ANEXOS	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Colônia de <i>A. flavus</i> com 5 dias de crescimento em meio BDA, incubada em câmara incubadora BOD a 25 °C.....	17
Figura 2. Meio BDA de onde foram retirados discos de micélio de 5 mm.....	17
Figura 3. Disco de micélio de 5 mm de diâmetro inoculado no centro da placa de Petri contendo meio de cultura YES.....	18
Figura 4. Placa de Petri contendo meio de cultura YES sem inoculação.....	18
Figura 5. Colônia de <i>A. flavus</i> , com 19 dias de crescimento, incubada em meio BDA, em câmara incubadora BOD a 25 °C, de onde foram retirados os discos de micélios (10 mm de diâmetro).....	21
Figura 6. Grãos de milho inoculados com 5 discos de micélio de 10 mm de diâmetro e 19 dias de crescimento.....	22
Figura 7. Média de crescimento de <i>Aspergillus flavus</i> , incubado durante 4 dias em meio de cultura artificial YES, nas temperaturas de 3, 10, 15, 20, 25, 30 e 42 °C. A barra de erro representa o desvio-padrão das 4 repetições de cada tratamento.....	28
Figura 8. Média da produção de aflatoxina total (B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂), em µg.kg ⁻¹ , por <i>A. flavus</i> incubado em meio de cultura YES, durante 14 dias, nas temperaturas de 25 e 30 °C.....	29
Figura 9. Crescimento visual de <i>A. flavus</i> em grãos de milho armazenados por 14 dias, em ambiente com umidade relativa de equilíbrio de 90%, nas temperaturas de 20, 25, 30 e 42 °C.....	32
Figura 10. Valores médios da produção de aflatoxina total (B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂) por <i>A. flavus</i> , em µg.kg ⁻¹ , em grãos de milho armazenados em diferentes temperaturas, durante 14 dias, em ambiente com umidade relativa de equilíbrio do ar de 90%.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores mínimos de atividade de água (a_w) para o crescimento e produção de toxina de fungos.....	8
Tabela 2. Limites máximos admissíveis de concentração de aflatoxinas.....	14
Tabela 3. Produção média de aflatoxina total (B_1 , B_2 , G_1 e G_2), em $\mu\text{g.kg}^{-1}$, por <i>A. flavus</i> incubado no meio de cultura YES, durante 14 dias, em diferentes temperaturas.....	29
Tabela 4. Temperatura e valores médios dos teores de água (% b.u.) dos grãos de milho.....	30
Tabela 5. Porcentagem de amostras em que se observou crescimento visual de <i>A. flavus</i> em grãos de milho armazenados em diferentes temperaturas durante 14 dias, com 4 repetições.....	31
Tabela 6. Produção média de aflatoxina total (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) por <i>A. flavus</i> , em $\mu\text{g.kg}^{-1}$, em grãos de milho armazenados em diferentes temperaturas, durante 14 dias, com 4 repetições.....	33

RESUMO

TRAVAGLIA, Diana Paris, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Crescimento de *Aspergillus flavus* e produção de aflatoxina em grãos de milho armazenados sob diferentes temperaturas.** Orientador: Adílio Flauzino de Lacerda Filho. Co-orientadores: José Benício Paes Chaves e Luiz Fernando Teixeira Albino.

Micotoxinas são metabólitos secundários do metabolismo de fungos podendo ser imunossupressoras, potencialmente carcinogênicas, teratogênicas e mutagênicas, sendo que as aflatoxinas são as mais potencialmente carcinogênicas. A melhor forma de prevenir a produção de micotoxinas é controlar os fatores que permitem o desenvolvimento de fungos. Assim, objetivou-se com este estudo determinar o crescimento do fungo *Aspergillus flavus* e sua produção de aflatoxina total (B1, B2, G1 e G2) em meio de cultura *Yeast Extract Sucrose* (YES) e em grãos de milho armazenados durante 14 dias, em ambiente com umidade relativa de equilíbrio de 90 %, nas temperaturas de 3, 10, 15, 20, 25, 30 e 42 °C. Foram utilizadas 4 repetições e os resultados foram avaliados de forma descritiva usando-se média simples e desvio-padrão. No 4º dia de incubação no meio YES, o diâmetro de crescimento do fungo a 15, 20, 25, 30 e 42 °C foi de 4, 20, 56, 81 e 19 mm, respectivamente, e a 3 e 10 °C não foi observado crescimento. Entretanto, a produção de aflatoxina total neste meio, realizada no 14º dia de incubação, foi detectada apenas nas temperaturas de 25 e 30 °C, nas concentrações de 8,7 e 10,3 µg.kg⁻¹, respectivamente. Nos grãos de milho, no 14º dia de armazenamento, foi observado o crescimento visual do *A. flavus* em todas as amostras armazenadas a 20, 25 e 30 °C, e em metade das amostras a 42 °C. A produção de aflatoxina total foi detectada a 15, 20, 25, 30 e 42 °C nas concentrações de 4,6; 899,2; 5.104,0; 5.654,0 e 63,7 µg.kg⁻¹, respectivamente. Assim, para as condições experimentais pode-se concluir que, no meio YES, o *Aspergillus flavus* é capaz de se desenvolver em diferentes temperaturas e sua capacidade de produzir aflatoxina total é maior na temperatura de 30°C. E, em grãos de milho, este microrganismo é capaz de se desenvolver em diferentes temperaturas e de produzir maior quantidade de aflatoxina total em ambiente

de armazenamento com temperatura de 30°C, para o mesmo valor de umidade relativa de equilíbrio.

ABSTRACT

TRAVAGLIA, Diana Paris, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2011. **Growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production in corn grains stored at different temperatures.** Adviser: Adílio Flauzino de Lacerda Filho. Co-advisers: José Benício Paes Chaves and Luiz Fernando Teixeira Albino.

Mycotoxins are secondary metabolites of the metabolism of fungi and can be immunosuppressive, potentially carcinogenic, teratogenic and mutagenic. Among them, aflatoxins are the most potentially carcinogenic. The best way to prevent the production of mycotoxins is to control the factors that allow the development of fungi. Thus, the objective of this study was to determine the growth of the fungus *Aspergillus flavus* and the production of total aflatoxina (B₁, B₂, G₁ and G₂) in culture medium Yeast Extract Sucrose (YES) and maize grains stored for 14 days, in an environment with equilibrium relative humidity of 90%, at temperatures of 3, 10, 15, 20, 25, 30 and 42 °C. Four repetitions were used and the results were analyzed descriptively using simple average and standard deviation. On the 4th day of incubation in medium YES, the diameter of fungal growth at 15, 20, 25, 30 and 42 °C was 4, 20, 56, 81 and 19 mm respectively, and at 5 and 10 °C was not observed growth. However, the production of total aflatoxin, performed only in the 14 th day of incubation, only occurred in this medium at temperatures of 25 and 30 °C, at concentrations of 8,7 and 10,3 µg.kg⁻¹, respectively. In maize, on the 14th day of storage, the visual growth of *A. flavus* was observed in all samples stored at 20, 25 and 30°C, and in half of the samples at 42 °C. Production of total aflatoxina in maize grain was detected at 15, 20, 25, 30 and 42 °C at concentrations of 4,6; 899,2; 5.104,0; 5.654,0 e 63,7 µg.kg⁻¹, respectively. Thus, for the experimental conditions can be conclude that, in the medium YES, the *Aspergillus flavus* is able to grow at different temperatures and it capacity to produce aflatoxina total is higher in temperature of 30 °C. And, in maize, this microorganism is able to grow at different temperatures and to produce greater quantity of total aflatoxin in storage environment with temperature of 30 °C for the same value of equilibrium relative humidity.

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) em função de seu potencial produtivo, composição química e valor nutritivo, é um dos mais importantes cereais cultivados e consumidos no mundo. Devido a sua multiplicidade de aplicações, é uma matéria-prima impulsionadora de diversos complexos agroindustriais, assumindo relevante papel socioeconômico (FANCELLI & DOURADO NETO, 2000).

No Brasil, cerca de 70 a 80% do milho produzido é destinado a indústria de ração animal (EMBRAPA MILHO E SORGO, 2009). Devido a sua qualidade nutritiva, o milho compõe a maior parte das rações animais.

Durante o armazenamento, este grão é submetido a diversos fatores que podem reduzir sua qualidade, como temperatura, teor de água e contaminação por fungos, sendo que, atualmente, esses microrganismos são considerados os principais causadores de danos e deterioração nos produtos agrícolas.

O crescimento de fungos na massa de grãos causa alteração do odor, descoloração, diminuição na quantidade dos nutrientes, produção de micotoxinas, como aflatoxinas, entre outros.

Micotoxinas são metabólitos secundários do metabolismo de fungos podendo ser imunossupressoras; potencialmente carcinogênicas, teratogênicas e mutagênicas; afetar órgãos como, rins e fígado, e causar efeitos estrogênicos tanto em animais quanto em humanos.

Essas toxinas são moléculas estáveis de difícil degradação e termorresistentes, assim não são degradadas durante o processamento de alimentos e também da ração, portanto permanecem nesses produtos podendo contaminar pessoas e animais. As temperaturas elevadas nas quais esses substâncias poderiam ser degradadas são inviáveis para o processamento de alimentos e de ração, pois degradariam esses produtos.

Amaral et al. (2006), pesquisando a ocorrência de aflatoxinas, demonstraram baixa ocorrência destas toxinas nos produtos à base de milho analisados, entretanto a Ingestão Diária Provável Média (IDPM) de AFB1 foi acima da Ingestão Diária Tolerável (IDT), indicando um risco de hepatocarcinogenicidade na população brasileira da Região Sul do Brasil, devido ao consumo de produtos à base de milho.

Assim, o controle dos metabólitos secundários é de extrema importância, uma vez que as indústrias de ração e de alimentos, e o setor de produção animal estão cada vez mais exigentes tanto para aumentar produtividade quanto para obter alimentos seguros e com qualidade. A melhor forma de prevenção é controlar o desenvolvimento de fungos na massa de grãos. E para isto é extremamente importante o conhecimento de todos os fatores que influenciam o crescimento de fungos para que estes fatores possam ser controlados durante as etapas de produção, colheita, secagem, armazenamento, processamento e distribuição. Segundo Silva (2008b), durante o armazenamento, a combinação baixo teor de água e baixas temperaturas é o meio mais eficiente para o controle desses microrganismos.

Realizando-se um levantamento da literatura existente a respeito das condições de crescimento de *A. flavus* e das condições de produção de aflatoxina durante o armazenamento de milho, como temperatura, teor de água, umidade relativa do ambiente, entre outras, pode-se notar que há poucos trabalhos recentes sobre essas condições, assim como poucas informações, no Brasil, a respeito da quantificação desta toxina em grãos de milho, produtos à base de milho e em rações.

Em vista disso, com este estudo objetiva-se determinar: (i) o crescimento de *Aspergillus flavus* e sua produção de aflatoxina total (B1, B2, G1 e G2) em meio de cultura artificial nas temperaturas de 3, 10, 15, 20, 25, 30 e 42 °C; e (ii) o crescimento de *Aspergillus flavus* e sua produção de aflatoxina total (B1, B2, G1 e G2) em grãos de milho armazenados nas temperaturas de 3, 10, 15, 20, 25, 30 e 42 °C.

Em vista disso, com este estudo objetivou-se avaliar: (i) o crescimento de *Aspergillus flavus* e sua produção de aflatoxina total (B1, B2, G1 e G2) em meio de cultura artificial nas temperaturas de 3, 10, 15, 20, 25, 30 e 42 °C; e (ii) o crescimento de *Aspergillus flavus* e sua produção de aflatoxina total (B1, B2, G1 e G2) em grãos de milho armazenados nas temperaturas de 3, 10, 15, 20, 25, 30 e 42 °C.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Milho

O milho (*Zea mays*) em função de seu potencial produtivo, composição química e valor nutritivo, é um dos mais importantes cereais cultivados e consumidos no mundo. Devido a sua multiplicidade de aplicações, é uma matéria-prima impulsionadora de diversos complexos agroindustriais, assumindo relevante papel socioeconômico (FANCELLI & DOURADO NETO, 2000).

O uso do milho como alimentação animal é a principal forma de consumo desse cereal, isto é, cerca de 70% do milho produzido no mundo e entre 70 e 80% do milho produzido no Brasil (EMBRAPA MILHO E SORGO, 2009).

As principais substâncias armazenadas pelas sementes são carboidratos, lipídeos e proteínas, e, em pequenas quantidades, ainda podem ser encontrados minerais, vitaminas e outras substâncias. Em geral, as sementes das gramíneas, como o milho, possuem alto teor de carboidratos, e as das leguminosas, alto teor de proteínas. O milho tem, em média, 64% de carboidrato, 5% de lipídeos e 10% de proteínas (SILVA, 2008a).

De acordo com Godoi (2005), o alto conteúdo de carboidratos, principalmente o amido, e de outros componentes, como proteínas e ácidos graxos, torna o milho importante produto comercial, que, em condições inadequadas de armazenamento, pode sofrer perdas nos valores quantitativos e qualitativos decorrentes, sobretudo, da infestação de pragas e da contaminação por fungos, desde o campo até a época de consumo.

2.2. Armazenamento

O objetivo do armazenamento é preservar as características que os grãos têm após a colheita, como a vitalidade dos grãos, a qualidade de moagem e as propriedades nutritivas como alimento (BROOKER et al., 1992).

Porém, durante o armazenamento, a massa de grãos é constantemente submetida a fatores físicos, químicos e biológicos que afetam a sua qualidade, como: temperatura, umidade relativa do ar, propriedades higroscópicas, atividade de água, presença de oxigênio, tempo de armazenamento,

contaminação por fungos, presença de insetos-praga e roedores, percentagem de grãos quebrados, impurezas, matérias estranhas e condições de limpeza e higiene do local de armazenamento (VILLA & ROA, 1979; BROOKER et al., 1992; SOUZA, 2003).

Segundo Silva (2008b), o teor de água é considerado o fator mais importante que atua no processo de deterioração dos grãos armazenados. Mantendo-o em níveis baixos, menor será a contaminação por microrganismos e também a respiração dos grãos. Acasio (1997) sugeriu que grãos com teor de água acima de 13% (b.u.) devem ser secados para reduzir os riscos de deterioração, na forma de perda de matéria seca pela respiração, infecção por fungos, produção de calor espontâneo e redução do percentual de germinação.

Para o armazenamento seguro do milho durante 12 meses, o teor ideal de água varia entre 12 e 13% (b.u.), podendo-se ter tolerância máxima de 14% (b.u.), quando aplicada corretamente a técnica de aeração. Para maiores intervalos de tempo de armazenagem, aconselha-se que, mesmo com os devidos cuidados, o teor de água máximo não ultrapasse os 11% (b.u.), principalmente para as regiões mais quentes e úmidas (SILVA et al., 2008c).

Segundo Padín et al. (2002), insetos-praga, ácaros, roedores e fungos são os principais causadores de perdas qualitativas dos grãos armazenados, sendo o desenvolvimento desses organismos influenciados por fatores ambientais. Entretanto, segundo Silva (2008b), atualmente os fungos são considerados os principais causadores de danos e deterioração nos produtos agrícolas, visto que no combate aos insetos-praga e roedores são empregadas técnicas modernas de controle.

O crescimento de fungos na massa de grãos causa alteração do odor e do poder germinativo; descoloração; acúmulo de ácidos graxos livres; diminuição na quantidade e qualidade dos nutrientes; compactação; aquecimento, que pode até levar a incêndio e, ou explosão; e produção de micotoxinas cuja presença afeta a liberação e comercialização internacional de produtos agrícolas (JULIAN et al., 1995; SABINO, 1996).

Segundo Santin (2000), a melhor forma de impedir as perdas nutricionais e a produção de micotoxinas está no controle de crescimento dos fungos, pelo controle das matérias-primas desde o cultivo no campo até o armazenamento. Segundo Silva (2008b) o melhor método para se evitar a

proliferação de fungos em grãos é a secagem do produto, em níveis de teor de água nos quais a disponibilidade de água não seja suficiente para ser utilizada no desenvolvimento desses microrganismos, sendo a combinação baixo teor de umidade e baixas temperaturas o meio mais eficiente para o controle dos fungos durante o armazenamento.

Para se evitar ou, ao menos, controlar a proliferação de fungos na massa de grãos é necessário o conhecimento dos fatores que afetam o desenvolvimento desses microrganismos.

2.3. Fungo

A maioria dos fungos encontrados, naturalmente, em grãos pertence a três gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Muitas espécies desse último gênero são patógenas de plantas, produzindo micotoxinas antes e imediatamente após a colheita, mas algumas espécies podem infectar grãos durante o armazenamento. Já os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são comumente encontrados se desenvolvendo e produzindo suas toxinas em grãos durante o armazenamento, mas certas espécies desses gêneros são capazes de infectar grãos no campo (PITT, 2000; RICHARD et al., 2003).

O desenvolvimento de fungos é dependente de fatores intrínsecos (inerentes ao substrato) e de fatores extrínsecos (inerentes às condições que envolvem o substrato), como: a atividade de água (a_w) do substrato, temperatura e umidade relativa do ambiente, pH do substrato, disponibilidade de oxigênio, potencial de oxidação-redução, interação microbiológica (competição microbiológica), composição do substrato (disponibilidade de nutrientes), linhagem do fungo contaminante, danos mecânicos, presença de materiais estranhos e impurezas, que são veículos de contaminação, e presença de insetos-praga e ácaros na massa de grãos, que também são veículos de contaminação e causam o rompimento dos grãos favorecendo a absorção de água e facilitando a invasão e a penetração de fungos nestes substratos, permitindo, desta forma, o desenvolvimento rápido de fungos (SCUSSEL, 1998; JAY, 2005).

Durante o armazenamento de grãos, o crescimento de fungos depende quase que exclusivamente do teor de água do substrato em equilíbrio com a umidade relativa do ar (UR). E a temperatura determina a velocidade de

crescimento desses microrganismos nos substratos, como grãos, nozes e rações (DHINGRA & COELHO NETTO, 1998).

2.3.1. Atividade de água (a_w), teor de água de equilíbrio e umidade relativa do ar

A água presente nos alimentos pode encontrar-se na forma de molécula livre ou ligada ao substrato. A atividade de água (a_w) é uma medida qualitativa que possibilita avaliar a disponibilidade de água livre que é suscetível a diversas reações (enzimáticas, oxidativas, hidrólises, etc.) e pode ser usada mais facilmente por microrganismos, ao passo que o teor de água é uma medida meramente quantitativa (massa de água/massa de matéria seca – kg/kg), medindo o percentual em peso, de toda água presente no alimento, tanto livre quanto ligada (SCOTT, 1957; FRAGA et al., 2003).

Essa disponibilidade de água livre em materiais higroscópicos, tais como frutos e grãos, indicada pela atividade de água pode ser, também, indicada pelo teor de água do produto quando em equilíbrio com a umidade relativa do ar ambiente, para determinada temperatura. A atividade de água no grão e a umidade relativa do ar, quando atingido o equilíbrio, são numericamente iguais (HALL, 1980; BROOKER et al., 1992).

O teor de água do produto, quando em equilíbrio com o ambiente, é denominado teor de água de equilíbrio ou equilíbrio higroscópico. O conceito teor de água de equilíbrio é importante porque está diretamente relacionado à secagem e armazenagem dos produtos agrícolas e é útil para determinar se o produto ganhará ou perderá água, segundo as condições de temperatura e umidade relativa do ar. Quando a razão da perda de água do produto para o ambiente é igual à razão do ganho de água, o produto está em equilíbrio com o ar ambiente, isto é, equilibraram-se as taxas de vaporização e condensação de água. O teor de água de equilíbrio é, portanto, o teor de água que se observa depois que os grãos foram expostos durante um intervalo de tempo prolongado a uma determinada condição ambiental (SILVA, 2008b).

O teor de água de equilíbrio de uma amostra de grãos depende ou é função da temperatura, da umidade relativa do ar, das condições físicas do

grão (SILVA, 2008b), da espécie, da variedade e da maturidade do grão (BROOKER et al., 1992).

Segundo Rigueira (2005), inúmeros autores têm estudado o comportamento higroscópico de vários produtos agrícolas utilizando métodos diferenciados para expressar o teor de água de equilíbrio em função da temperatura e umidade relativa do ar (isotermas de sorção). Para o estabelecimento de isotermas que representem essa relação de equilíbrio são utilizados modelos matemáticos empíricos capazes de predizer, com precisão, a umidade de equilíbrio, para uma ampla faixa de temperatura e umidade relativa do ar.

De acordo com Rodovalho (2008), o modelo de Chung & Pfoest modificado (PFOEST et al., 1976) (Equação 1) é utilizado por muitos autores para representar o equilíbrio higroscópico de cereais como Corrêa et al. (2006), Resende et al. (2006) e Goneli et al. (2007).

(1)

$$U_e = A - B * \ln(-(T+C)*\ln(UR))$$

em que,

UR = umidade relativa de equilíbrio, decimal.

U_e = teor de água de equilíbrio dos grãos em base seca, %.

T = temperatura, °C;

A, B e C = constantes dos grãos e correspondem a 0,339; 0,059 e 30,205, respectivamente, para o milho (SILVA, 2008b).

2.3.2. Crescimento de Fungos e Produção de Micotoxinas

Sob determinadas condições de temperatura e teor de água, os esporos dos fungos são capazes de germinar, formar hifas, desenvolver seu micélio sobre a massa de grãos e produzir micotoxinas. Segundo Pereira et al. (2002) tanto para o crescimento de fungos quanto para a produção de micotoxinas são

necessárias condições especiais que favoreçam seu desenvolvimento e a produção da micotoxina.

As condições ótimas para a produção de micotoxinas podem não ser as mesmas para o crescimento do fungo (Tabela 1). Ramakrishna et al. (1996) afirmam que a produção e concentração dessas substâncias são determinadas por efeitos combinados das espécies de fungos presentes, da temperatura e do teor de água do grão.

Assim, podem-se ter fungos crescendo na massa de grãos sem que haja produção de toxinas.

Tabela 1. Valores mínimos de atividade de água (a_w) para o crescimento e produção de toxina de fungos

Fungo	a_w mínima		Micotoxina Produzida
	Crescimento	Produção	
<i>Aspergillus flavus</i>	0,78 – 0,80	0,83 – 0,87	Aflatoxina
<i>Aspergillus ocrhaceus</i>	0,77 – 0,83	0,83 – 0,87	Ocratoxina A
<i>Penicilliumm cyclopium</i>	0,81 – 0,85	0,87– 0,90	Ocratoxina

Fonte: adaptado de Beauchat, 1981.

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) estima-se que 25% dos grãos no mundo estejam contaminados com micotoxinas (REDAÇÃO, 2002), o que é um valor consideravelmente alto.

Por outro lado, a ausência de fungos no alimento, não significa ausência de micotoxinas, ou seja, o fungo pode estar ausente, mas a toxina pode estar presente e ativa (OSBORNE, 1982; PITT & HOCKING, 1997; TANIWAKI & SILVA, 2001). Isto ocorre, pois as condições para crescimento do fungo se alteraram e este já não é mais capaz de se desenvolver no substrato, mas as toxinas que já foram produzidas permanecem no produto (FERREIRA et al., 2006).

2.3.2.1. *Aspergillus flavus*

O gênero *Aspergillus* tem um grande número de espécies presentes em diversos nichos ecológicos. Embora sejam distribuídos mundialmente, esses

fungos são mais comuns em clima subtropical e temperado quente (RICHARD et al., 2003).

Entre esses fungos encontra-se o *Aspergillus flavus*, que é um fungo produtor de aflatoxinas e é mesofílico, com ótimo de temperatura para crescimento entre 35 e 38°C, mínimo entre 8 e 15°C e máximo entre 40 e 45°C (DHINGRA & COELHO NETTO, 1998; RICHARD et al., 2003). Este fungo requer uma atividade de água mínima entre 0,78 e 0,80 para o crescimento e 0,83 a 0,87 para produção de toxina (BULLERMAN et al., 1984; MALLOZZI & CORRÊA, 1998).

Desde que haja presença de inóculo, em quantidade suficiente na época mais suscetível, altas temperaturas e estresse hídrico são os dois fatores primordiais para colonização e formação de aflatoxinas nos grãos em pré-colheita. Durante o armazenamento, o crescimento deste fungo depende quase que exclusivamente do teor de água do substrato em equilíbrio com a umidade relativa do ar (UR) de 85 a 95%. E a temperatura determina a velocidade de crescimento desse microrganismo nos substratos, como grãos, nozes e rações (DHINGRA & COELHO NETTO, 1998).

2.3.2.2. Micotoxinas

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos com diferentes estruturas (DESHPANDE, 2002).

Segundo Jay (2005), os metabólitos primários dos fungos, como os de outros organismos, são aqueles essenciais ao crescimento. Já os metabólitos secundários são formados durante o final da fase exponencial de crescimento e não possuem significância aparente para o crescimento ou metabolismo do organismo produtor. Em geral, os metabólitos secundários parecem ser formados quando grandes quantidades de precursores de metabólitos primários, tais como aminoácidos, acetato, piruvato e outros, são acumuladas. A síntese de micotoxinas representa uma maneira dos fungos reduzirem a quantidade desses precursores.

Existem mais de 100 espécies de fungos produtores de toxinas e até agora já foram identificados mais de 300 compostos como micotoxinas (MURRAY et al., 2006).

Estes compostos possuem propriedades toxicológicas que induzem uma variedade de efeitos tóxicos em humanos e animais, quando são ingeridos alimentos contaminados com esses compostos. Os efeitos tóxicos incluem toxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade, teratogenicidade e efeitos estrogênicos (DESHPANDE, 2002).

As micotoxinas que possuem maiores riscos potenciais à saúde humana e animal, como contaminantes de alimentos e rações, são as aflatoxinas, tricotecenos, fumonisinas, zearalenona, ocratoxina A e o ergot. (RICHARD et al, 2003).

Peraica et al. (2002) afirmaram que é possível encontrar resíduos de micotoxinas em produtos de origem animal, como carne, ovos, leite e queijos, devido à ingestão de produto contaminado na dieta utilizada na alimentação de animais. Murphy et al. (2006) relataram a presença de resíduos de fumonisinas em carne de aves e suínos e em ovos de poedeiras e encontraram aflatoxinas também em carne de aves e suínos.

A presença de micotoxinas contribui para a redução da qualidade dos alimentos, pois, dependendo da concentração encontrada de micotoxina, estes alimentos deixam de ser seguros para o consumo humano. Como exemplos, a ingestão de fumonisinas, que tem sido associada a câncer esofágico em humanos (SCUSSEL, 2000; MARASAS, 1996), e a ingestão de aflatoxinas que tem sido associada ao câncer hepático (FERREIRA *et. al.*, 2006).

Amaral et al. (2006), pesquisando a ocorrência de aflatoxinas em produtos derivados de milho, demonstraram que das 123 amostras analisadas, apenas 5,7% foram positivas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD); e, embora as quantidades de aflatoxinas encontradas na maioria destas amostras estivessem abaixo do permitido pela legislação brasileira (BRASIL, 2002), esses valores eram de extrema importância, pois mesmo em pequenas quantidades as aflatoxinas poderiam causar problemas de saúde em longo prazo. E ainda concluíram que, considerando o peso médio da população adulta como sendo 70 kg, a Ingestão Diária Provável Média (IDPM) de aflatoxina B₁ foi de 0,34 ng/Kg p.c./dia. Portanto, a ingestão média estimada de aflatoxina B₁ foi maior que a Ingestão Diária Tolerável (IDT), que é de 0,15 ng/Kg p.c./dia, segundo Kuiper-Goodman (1995).

As matérias-primas e derivados são, normalmente, contaminados por mais de uma micotoxina, porque alguns fungos são capazes de produzir diferentes micotoxinas (PERAICA et al., 2002). A coexistência de mais de uma substância micotóxica pode gerar efeitos sinérgicos, agravando os efeitos gerados por estes metabólitos secundários (RICHARD et al, 2003).

Os sintomas iniciais e a gravidade de uma micotoxina dependem do tipo de micotoxina, da quantidade ingerida, da duração e da via de exposição, da idade, do sexo e do estado da pessoa ou do animal exposto (MURRAY et al., 2006; RICHARD et al, 2003).

As micotoxinas podem se manifestar como um processo agudo ou crônico que compreende desde a morte rápida até a formação de um tumor tanto em seres humanos (MURRAY et al., 2006) quanto em animais .

2.4. Aflatoxinas

Aflatoxina é um termo coletivo para um grupo de toxinas produzidas por algumas cepas de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, entre outros, durante o crescimento destes em substrato favorável à sua produção. Todas as formas de aflatoxinas são compostos heterocíclicos altamente oxigenados e têm um núcleo de cumarina fundida com bifurano e contém um anel pentenona ou uma lactona. As duas principais formas de aflatoxinas, B e G (*blue* e *green*), caracterizadas e visualizadas pela cor da sua fluorescência em UVP (ultravioleta próximo), são subclassificadas como B₁, B₂, G₁ e G₂, de acordo com a cor e sequência da localização no cromatograma de camada delgada. A pequena diferença estrutural entre elas é responsável por altíssima diferença, na toxidez de cada uma, sendo aflatoxina B₁ a mais tóxica e a mais comum de todas (DHINGRA & COELHO NETTO, 1998). As aflatoxinas B₁ e G₁ são consideravelmente mais tóxicas que B₂ e G₂ (JAIMEZ et al., 2000; JAY, 2005).

Segundo Taniwaki (1993), existem linhagens de *A. flavus* que não produzem aflatoxinas, outras que só produzem as do grupo B e outras que só produzem as do grupo G. E inúmeras pesquisas têm demonstrado que há considerável variação na capacidade para produzir aflatoxinas por essas linhagens, mesmo quando são isoladas da mesma fonte.

Essas toxinas podem ser encontradas em milho, amendoim, algodão, amêndoa, pistache, nozes, entre outros (RICHARD et al, 2003).

As aflatoxinas causam efeitos patológicos, tanto em humanos quanto em animais, como hepatotoxicidade (lesões no fígado), hiperplasia dos ductos biliares, hemorragia, carcinogênese (tumores hepáticos), redução da imunidade, entre outros (RICHARD et al., 2003).

A faixa de temperatura ótima para a produção de aflatoxina, segundo Gourama & Bullerman (1995) é de 25 a 28 °C, e segundo Richard et al. (2003), é de 25 a 30 °C. De acordo com Guo et al. (2008), açúcares simples com glicose, sacarose e maltose promovem a formação dessa toxina, enquanto peptona, sorbose ou lactose não promovem sua formação. Fontes de nitrogênio afetam a formação de aflatoxinas de diversas formas e os níveis de produção são diferentes quando *Aspergillus spp.* está em meio com nitrato ou em meio com nitrito.

As aflatoxinas têm ponto de fusão alto e são estáveis ao calor sendo decompostas à temperatura de cerca de 220 °C (SCUSSEL, 1984). Como este valor de temperatura é inviável para o processamento da maioria dos alimentos e rações, e, segundo Souza (2003), outros métodos, como remoção física de grãos contendo fungos, remoção de aflatoxina por solventes polares e degradação de aflatoxinas por substâncias químicas ou microorganismos, são muitas vezes economicamente inviáveis, estas substâncias permanecem nesses produtos podendo assim contaminar pessoas e animais.

2.4.1. Métodos Analíticos para Determinação de Micotoxinas

Os métodos analíticos convencionais para micotoxinas incluem cromatografia de camada fina, cromatografia líquida de alta resolução e cromatografia gasosa (GILBERT & VARGAS, 2003; ZHENG et al., 2006). Contudo, em razão de extensivas etapas na preparação das amostras antes da análise, algumas vezes torna-se limitada sua aplicação prática (LÚCIO et al., 2007).

Como alternativas, têm sido utilizados métodos imunoquímicos, considerados rápidos e baratos (LÚCIO et al., 2007). Os mais comuns são o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) aprovado como método oficial da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) para triagem de aflatoxina, *Radio-Immuno-Assay* (RIA) e *Immunoaffinity Chromatography* (IAC) (AMADO, 2002). Dentre esses métodos, a técnica ELISA, que inclui testes

diversos, tem sido utilizada por mais de uma década em análises de micotoxinas (CHU, 1998), principalmente em testes competitivos (RAMARISHMA & MEHAN, 1993).

Na análise pelo método ELISA competitivo direto, a micotoxina extraída da amostra é misturada ao conjugado toxina-enzima e esta mistura é adicionada a micropoços contendo anticorpos. Assim, a micotoxina da amostra e o conjugado toxina-enzima competem pela ligação aos anticorpos. Quanto maior a quantidade de toxina presente na amostra, menor é a ligação entre o anticorpo e o conjugado toxina-enzima e menor é o sinal gerado pelo ensaio (a intensidade da cor é inversamente proporcional à concentração de micotoxina na amostra). Essa cor é mensurada opticamente usando-se um leitor de micropoços com filtro de absorbância. As densidades ópticas (DO) das amostras são então comparadas as DO dos padrões e um resultado interpretativo é determinado (RICHARD et al., 2003; ROMER LABS, 2007).

Como vantagens, os testes baseados na técnica ELISA podem ser quantitativos, simples, específicos, sensíveis e requerem pequenos volumes de amostras. Além disso, apresentam potencial de utilização no campo e exigem procedimentos simples de extração se comparados aos métodos analíticos convencionais, permitindo processamento de um grande número de amostras em tempo relativamente curto (BERGERE, 1991; HEFLE, 1995; BARNAVETRO, 1996; LÚCIO et al., 2007).

Como desvantagem desta técnica existe o fato de que qualquer fator que diminua a ligação entre o conjugado toxina-enzima e o anticorpo, pode ser confundido com a micotoxina da amostra. Assim, o teste indicará um valor superestimado de micotoxina. Mas, para reduzir esse tipo de interferência, os kits ELISA devem ser usados somente nos alimentos para os quais tenham sido extensivamente testados (RICHARD et al., 2003).

De acordo com Richard et al. (2003), o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos aprova "kits" para a análise de micotoxina em grãos.

2.5. Legislação

No Brasil, os níveis de micotoxinas permitidos em determinados alimentos destinados ao consumo humano são definidos pelo Ministério da Saúde pela Resolução - RDC nº 274, de 15 de outubro de 2002 (BRASIL, 2002). Esta resolução aprova o "Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos

de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho". Na Tabela 2, encontram-se os valores máximos permitidos da concentração dessas substâncias nos alimentos abrangidos por esta resolução.

Tabela 2. Limites máximos admissíveis de concentração de aflatoxinas

Alimento	Aflatoxina	Limite Máximo
Leite fluido	M ₁	0,5 µg/L
Leite em pó	M ₁	5 µg/L
Milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído)	(B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂)	20,0 µg.kg ⁻¹
Farinhas ou sêmolos de milho	(B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂)	20,0 µg.kg ⁻¹
Amendoim (com casca, descascado, cru ou tostado)	(B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂)	20,0 µg.kg ⁻¹
Pasta de amendoim ou Manteiga de Amendoim	(B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂)	20,0 µg.kg ⁻¹

Fonte: BRASIL, 2002.

Para os demais alimentos ainda prevalece a Resolução - CNNPA nº 34, de 1976, do Ministério da Saúde (BRASIL, 1977). De acordo com esta resolução o nível de aflatoxinas (B₁+G₁) permitido é de 30 µg.kg⁻¹.

Já os níveis de micotoxinas nas matérias-primas e nas rações destinadas a alimentação animal são definidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) pela Portaria MA/SNAD/SFA No. 07, de 09/11/88 (BRASIL, 1988). De acordo com esta portaria o nível máximo de aflatoxinas permitido é de 50 µg/kg. O MAPA não especifica quais metabólitos, mas depreende-se que seja a somatória de B₁+B₂+G₁+G₂. O limite é válido para todo e qualquer produto, seja para alimentação direta ou como ingrediente para rações. A Portaria citada especifica quais os produtos nela enquadrados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Proteção de Plantas do Departamento de Fitopatologia (DFP) e no Núcleo de Pesquisa e Treinamento em Pós-Colheita (NUPETRE) do Departamento de Engenharia Agrícola, da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

3.1. Análises estatísticas

O experimento foi realizado, com 4 repetições, incubando-se meio de cultura YES e grãos de milho inoculados com *A. flavus*, em câmaras incubadoras do tipo BOD (BOD), nas temperaturas de 3, 10, 15, 20, 25, 30 e 42 °C, durante 14 dias.

Os resultados foram analisados por meio de análise descritiva utilizando-se média aritmética simples e desvio-padrão.

3.2. Isolado utilizado

O isolado de *Aspergillus flavus* foi obtido na micoteca do DFP/UFV.

3.3. Grãos de milho

Foram adquiridos 30 kg de grãos de milho provenientes da região de Viçosa-MG. Para a análise de aflatoxina total (B₁, B₂, G₁ e G₂) foram coletadas 10 amostras aleatoriamente, contendo 100 g, utilizando-se um amostrador CM 2260 7/8 x 60 cm.

3.3.1. Análise de micotoxina

A análise quantitativa de aflatoxina total (B₁, B₂, G₁ e G₂) nos grãos de milho foi realizada no Laboratório MercoLab, unidade de Cáscavel – PR, utilizando-se o Kit ELISA AgraQuant® Mycotoxin, fornecido pelo Romer Labs, de acordo com as instruções deste fabricante (ROMER LABS, 2007).

O Kit ELISA AgraQuant® é um ensaio por competição direta de enzimas imuno-adsorvidas (ELISA) que determina quantitativamente o nível presente de micotoxinas e foi desenvolvido para uso em grãos, cereais, castanhas, ração animal e outros produtos.

3.4. Colonização em meio de cultura artificial

3.4.1. Meio de cultura artificial

O meio de cultura artificial utilizado foi o *Yeast Extract Sucrose (YES)*, contendo 2 g de extrato de levedura, 150 g de sacarose, 20 g de Agar, 0.5 g de sulfato de magnésio e 1000 mL de água destilada, e atividade de água em torno de 0,98.

No preparo do meio *YES*, após o extrato de levedura, a sacarose, o sulfato de magnésio e a água destilada serem misturados e homogeneizados, o pH dessa mistura foi ajustado para 5,9 com adição de gotas de NaOH 0,1 N, com auxílio de um pagâmetro 654 *Metroh*. Isto foi realizado para promover a produção de aflatoxina, pois segundo Molina e Giamuzzi (2002) nesse valor de pH a produção aflatoxina B₁ é elevada.

Em seguida, o Agar foi adicionado à mistura e, após homogeneização, o meio foi fundido e esterilizado a 120 °C durante 20 min, a 1 atm, em autoclave vertical mod. 415 da FANEM.

3.4.2. Inoculação em meio de cultura

Para o preparo dos discos de micélio, foi realizada uma suspensão de esporos adicionando-se 5 mL de água destilada e esterilizada a uma placa de Petri (diâmetro de 60 mm) contendo colônia de *A. flavus* com 5 dias de crescimento (Figura 1) em BOD a 25 °C, no meio Agar Batata Dextrose (BDA – 200 g de infusão de batata, 20 g de dextrose e 15 g de Agar). Após agitação manual, 1 mL dessa suspensão foi pipetada e adicionada a uma placa de Petri (diâmetro de 86 mm) contendo o meio BDA. A suspensão foi então espalhada com alça de *Drigalsky* ao longo da superfície do meio e o seu acúmulo foi retirado vertendo-se a placa, que, então, foi selada com filme de plástico (*rolopack*). Assim, os discos de micélio foram recortados e retirados desse meio (Figura 2).

No centro de cada placa de Petri de 86 mm de diâmetro, previamente esterilizada e contendo o meio de cultura *YES*, foi inoculado 1 disco de micélio de 5 mm de diâmetro (Figura 3). A inoculação foi realizada em câmara de fluxo para se evitar contaminação.

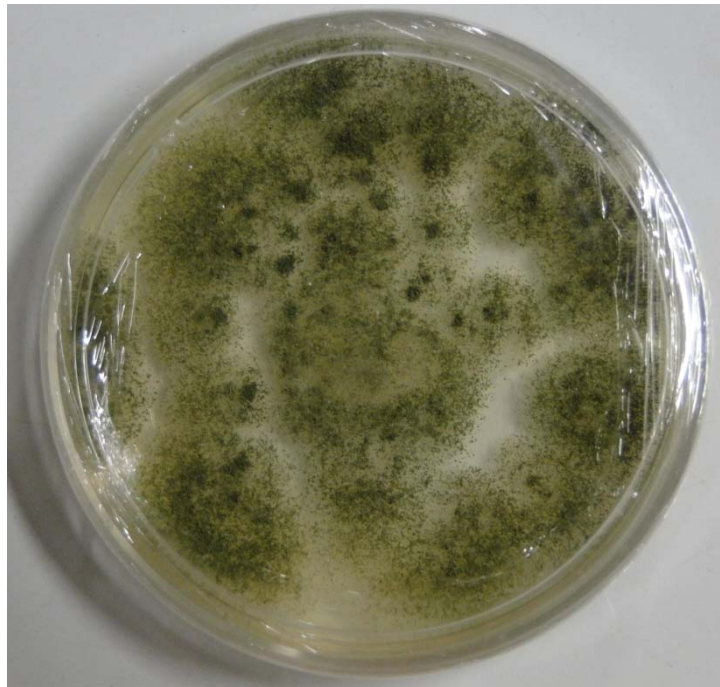


Figura 1. Colônia de *A. flavus* com 5 dias de crescimento em meio BDA, incubada em câmara incubadora BOD a 25 °C.



Figura 2. Meio BDA de onde foram retirados discos de micélio de 5 mm.

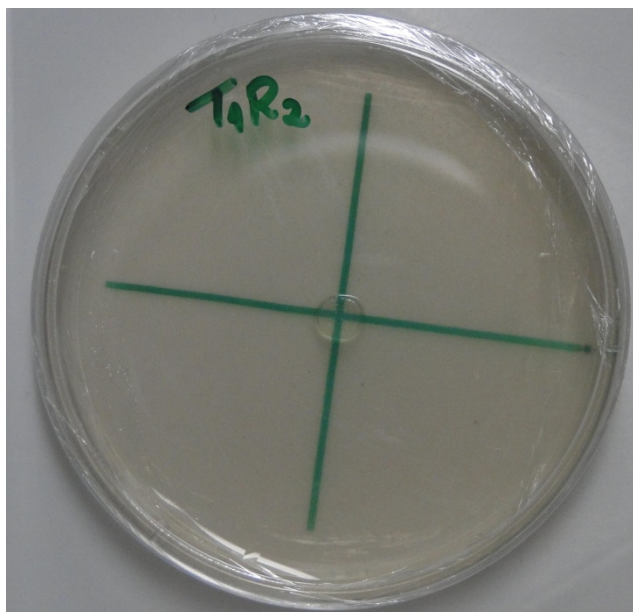


Figura 3. Disco de micélio de 5 mm de diâmetro inoculado no centro da placa de Petri contendo meio de cultura YES.

3.4.3. Incubação do meio de cultura

Imediatamente após a inoculação, as placas inoculadas com *A. flavus* foram incubadas por 14 dias, em câmaras incubadoras BOD's, no escuro, nas temperaturas de 3, 10, 15, 20, 25, 30 e 42 °C. Para cada temperatura, foi incubada também uma placa contendo apenas o meio YES (Figura 4).

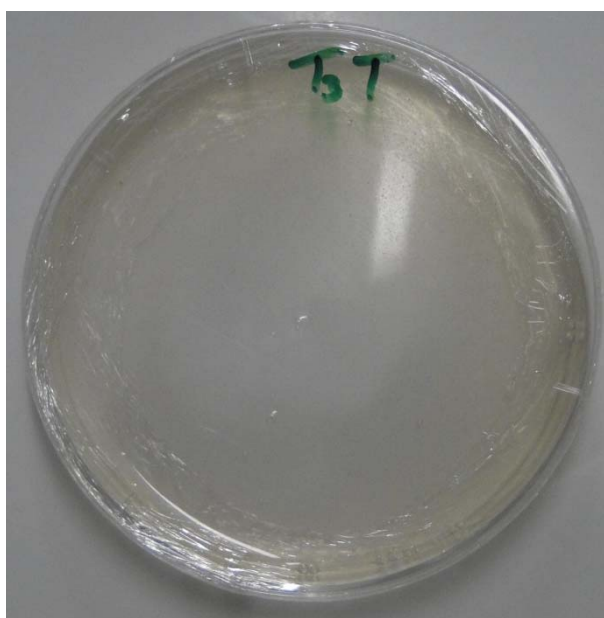


Figura 4. Placa de Petri contendo meio de cultura YES sem inoculação.

As placas foram armazenadas de forma invertida para se evitar a dispersão de esporos, que possivelmente seriam produzidos, e assim impedir que novas colônias comesçassem a crescer e confundissem a medição da colônia que estava sendo acompanhada.

Durante o período de incubação, a temperatura das BOD's foi monitorada diariamente com termo-higrômetro digital da marca *Incoterm*, com precisão de ± 1 °C.

3.4.4. Determinação do crescimento da colônia

O crescimento radial da colônia foi determinado em intervalos regulares de 24h, em duas direções perpendiculares, utilizando-se régua milimetrada, sendo descontados 5 mm (diâmetro do disco de micélio) do valor medido e mantendo-se a placa invertida.

3.5. Colonização em grãos de milho

3.5.1. Preparo dos grãos de milho

Após a análise de aflatoxina total e a confirmação de que os grãos de milho estavam isentos desta micotoxina (ANEXO I), o milho foi esterilizado a 120 °C, durante 20 min, a 1 atm, em autoclave SERCON, em frascos *Elenmeyers* de 500 mL contendo, aproximadamente, 192 g de grãos. Durante a esterilização os frascos estavam tampados com algodão e papel alumínio, e vedados com elástico.

No fim desta etapa, os frascos foram deixados em repouso durante 3 dias, sobre a bancada do laboratório, para homogeneização do teor de água, à temperatura de 25 °C, aproximadamente.

Após o repouso, o teor de água dos grãos de milho foi determinado e posteriormente foi ajustado utilizando-se o modelo modificado proposto por Chung & Pfoest (PFOST et. al, 1976) (Equação 1). Para cada temperatura de armazenamento foi calculado o teor de água de equilíbrio para os grãos, correspondendo ao ambiente de armazenagem a 90% de umidade relativa de equilíbrio. Isto para garantir que os grãos de milho usados em cada temperatura tivessem o mesmo valor de atividade de água (0,90).

Além disso, para a temperatura de 15°C, foi calculado também o teor de água de equilíbrio correspondendo a um ambiente a 70 % de umidade relativa de equilíbrio, e assim, grãos com atividade de água de 0,70.

O ajuste do teor de água foi realizado com adição de água, deionizada e esterilizada, aos frascos de 500 mL contendo os grãos, de acordo com a equação 2, que foi utilizada para 100 g de grão. Após a adição dessa água, os frascos foram agitados manualmente e deixados em repouso durante 3 dias, à temperatura de, aproximadamente, 25 °C, para obtenção da homogeneização do teor de água dos grãos.

$$m_a = (U_f - U_i) / (100 - U_i) \times 100 \quad (2)$$

em que,

m_a = massa de água a ser adicionada em 100 g de grão, g.

U_i = teor inicial de água em base úmida, %.

U_f = teor final de água em base úmida, %.

Após os 3 dias para homogeneização, o teor de água das amostras de grãos foi novamente determinado. Esse valor corresponde ao teor de água inicial do armazenamento.

Dos frascos de 500 mL foram retiradas as amostras para a determinação do teor de água e 100 g de grãos de milho. Esta quantidade de grãos foi transferida para cada frasco *Erlenmeyer* de 250 mL.

Para a determinação do teor de água dos grãos de milho foi utilizado o método de estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 105 ± 2 °C, durante 24 horas, em três repetições, conforme as recomendações contidas nas Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 2009).

3.5.2. Inoculação dos grãos de milho

Para a inoculação, os discos de micélio foram retirados de placas de Petri contendo colônias de *A. flavus*, com 19 dias de crescimento, incubadas em meio BDA, em BOD a 25 °C (Figura 5).

Foram inoculados 5 discos de micélio de 10 mm de diâmetro em 100 g de milho esterilizado, com teor de água ajustado, contidos em *Erlenmeyer* com capacidade de 250 mL. Este procedimento foi realizado em câmara de fluxo para se evitar contaminação. Os frascos foram agitados manualmente, tampados com algodão e papel alumínio, e vedados com elástico (Figura 6).

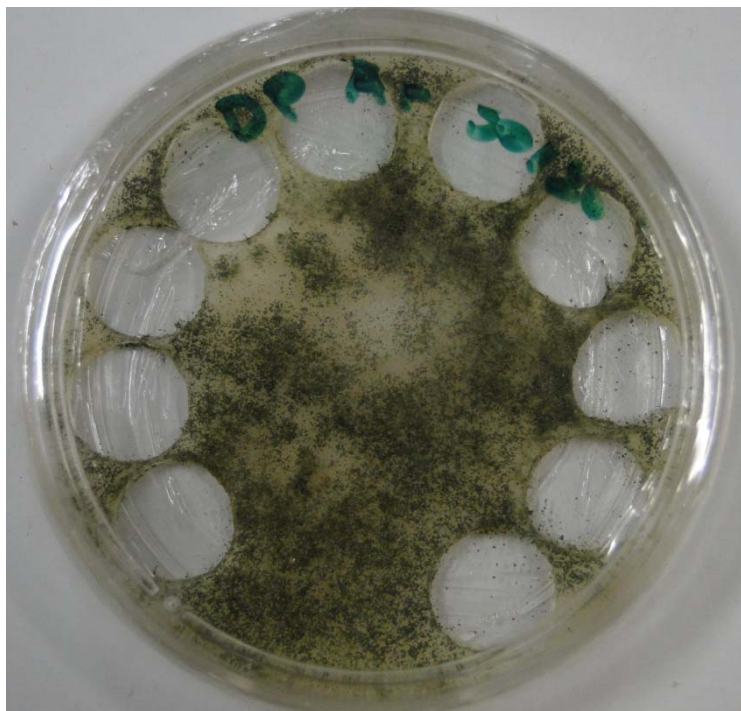


Figura 5. Colônia de *A. flavus*, com 19 dias de crescimento, incubada em meio BDA, em câmara incubadora BOD a 25 °C, de onde foram retirados os discos de micélios (10 mm de diâmetro).



Figura 6. Grãos de milho inoculados com 5 discos de micélio de 10 mm de diâmetro e 19 dias de crescimento.

3.5.3. Incubação dos grãos de milho

Os frascos contendo grãos de milho inoculados com *A. flavus* foram incubados, imediatamente após a inoculação, por 14 dias, em câmaras incubadoras BOD's, no escuro, nas temperaturas de 3, 10, 15, 20, 25, 30 e 42 °C.

Para cada temperatura foi incubado um frasco contendo apenas grãos de milho a fim de se confirmar que estes não continham aflatoxina total (B_1 , B_2 , G_1 e G_2).

Durante o período de incubação, a temperatura das BOD's foi monitorada diariamente com termo-higrômetro digital da marca *Incoterm*, com precisão de ± 1 °C.

3.5.4. Avaliação do crescimento fúngico

A formação de hifas e a presença de conídios ao redor dos grãos de milho foram avaliadas visualmente no 14º dia de armazenamento, em câmaras incubadoras BOD's, nas temperaturas de 3, 10, 15, 20, 25, 30 e 42 °C.

3.5.5. Determinação do teor de água ao final do período de incubação

Após a avaliação do crescimento do fungo, foram retirados 30 g de milho de cada frasco de 250 mL, que continha 100 g de milho inoculado, para determinação do teor de água ao final do período de incubação em estufa com circulação forçada de ar (BRASIL, 2009).

3.6. Avaliação de aflatoxina no meio de cultura artificial e nos grãos de milho

No final do período de incubação, as amostras do meio de cultura *YES* e de grãos de milho foram acondicionadas em freezer a -20 °C para que o crescimento do fungo fosse paralisado até que as análises de micotoxinas fossem realizadas.

A análise quantitativa de aflatoxina total (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) foi realizada utilizando-se o Kit ELISA AgraQuant® Determinação de Aflatoxinas Totais 4/40, fornecido pelo Romer Labs, tanto no meio de cultura artificial quanto nos grãos de milho. Este kit tinha limite de detecção de $3 \mu\text{g.kg}^{-1}$, limite de quantificação de $4 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e faixa de quantificação de 4 a $40 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

O preparo da amostra, a extração e a quantificação da aflatoxina total foram realizadas segundo as instruções do fabricante contidas no manual do kit ELISA para aflatoxina total (ROMER LABS, 2007), e estão descritas no item 3.6.1. Durante esses procedimentos as amostras, os reagentes e os componentes do kit foram mantidos à temperatura de, aproximadamente, 25 °C para que o resultado da análise não fosse comprometido, pois a temperatura interferiria nas reações ocorridas durante essa análise.

3.6.1. Análise quantitativa de aflatoxina no meio *YES*

Todo o conteúdo do interior da placa de Petri (meio de cultura, colônia fúngica e disco de micélio) foi removido e macerado para a homogeneização da amostra. Deste macerado foram retirados 5 g, que foram misturados com 25 mL de solução de extração metanol/água (70/30 % - V/V), para as amostras em que se esperava contaminação de aflatoxina entre 4 e $40 \mu\text{g.kg}^{-1}$, e com 100 mL, para as amostras em que se esperava contaminação maior que $40 \mu\text{g.kg}^{-1}$. A mistura foi agitada, vigorosamente, durante 3 min e o extrato foi filtrado, com papel de filtro qualitativo nº 1, sendo o filtrado coletado. Como condição excessivamente alcalina ($\text{pH} > 8$) ou ácida ($\text{pH} < 6$) poderia afetar o resultado

da análise de micotoxina, o pH do filtrado foi medido, em peagâmetro *Quimis*®, e quando esse se encontrava fora da faixa de 6 a 8, gotas de NaOH ou HCl a 0,1 N foram adicionadas para adequá-lo a estes valores. O extrato filtrado foi armazenado em câmara incubadora BOD a 5°C até o momento da análise com o Kit ELISA.

A quantidade de solução de extração foi determinada para que o resultado de aflatoxina se enquadrasse na faixa de quantificação (4 a 40 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) do método de ELISA. De acordo com o manual do kit (ROMER LABS, 2007), para quantificação de amostras com nível acima de 40 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, as amostras deveriam ser diluídas até que o resultado da amostra diluída se situasse na faixa de 5 - 40 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, sendo este método validado para amostras com concentração acima de 320 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

As placas de Petri contendo apenas o meio *YES* também foram analisadas quanto à presença de aflatoxinas, como descrito acima, para se ter certeza de que as aflatoxinas não estavam presentes no meio utilizado.

A descrição das etapas da análise para quantificação da aflatoxina total foram descritas a seguir de acordo as informações contidas no manual do Kit ELISA AgraQuant® Determinação de Aflatoxinas Totais 4/40 (ROMER LABS, 2007).

- I. O número necessário de tiras de diluição azul/verde foi colocado num recipiente para tiras de micropoços, sendo que um poço diluição foi requerido para cada padrão (ex. 0, 4, 10, 20 e 40 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) e cada amostra;
- II. Tiras de micropoços revestidos com anticorpos foram colocadas, em igual número do item anterior, num recipiente para tiras de micropoços;
- III. Usando uma pipeta de canal único, 100 μL do conjugado (frasco de tampa verde) foram colocados dentro de cada micropoço de diluição azul/verde;
- IV. Usando uma pipeta de canal único, foram acrescentados 50 μL de cada padrão ou amostra dentro de cada poço de diluição azul/verde contendo 100 μL de conjugado. A mistura foi então agitada, cuidadosamente, pipetando-se e esvaziando-se a ponteira 3 vezes. Ponteiras novas foram utilizadas para cada padrão ou amostra.

- V. Imediatamente após a mistura descrita no item IV, foram transferidos 100 µL da mistura de cada micropoço de diluição azul/verde para cada micropoço, correspondente, revestido com anticorpos. Os micropoços foram incubados à temperatura ambiente (25 °C) durante 15 min, contados a partir do último micropoço que foi preenchido;
- VI. Após esses 15 min, os micropoços foram esvaziados dentro de um recipiente de descarte e cada micropoço foi preenchido com água deionizada e, em seguida, esvaziado. Esse procedimento foi repetido 4 vezes, num total de 5 lavagens;
- VII. Após a 5ª lavagem, os micropoços foram levemente batidos sobre papel absorvente para expelir o máximo possível de água residual e o fundo de cada micropoço foi secado com papel absorvente;
- VIII. Usando uma pipeta de canal único, 100 µL do substrato (frasco de tampa azul) foram pipetados para dentro de cada micropoço seco. Os micropoços foram, então, incubados por exatos 5 min a partir do primeiro micropoço preenchido;
- IX. Imediatamente após os 5 min, 100 µL da solução stop (frasco de tampa vermelha) foram pipetados, com pipeta de canal único, para dentro de cada micropoço. Nesta etapa a cor da solução mudou de azul para amarelo, conforme deveria ocorrer;
- X. Os micropoços foram lidos no leitor de ELISA “STAT FAX 303+”, que determinou a absorbância da amostra e gerou o resultado da concentração de micotoxina em partes por bilhão (ppb), sendo que 1 ppb equivale a 1 µg.kg⁻¹.

3.6.2. Análise quantitativa de aflatoxina no milho

O milho inoculado, aproximadamente 70 g, que restou em cada *Erlenmeyer* com capacidade de 250 mL, após a determinação do teor de água no final da incubação, foi triturado, sem os discos de micélio, em liquidificador, modelo *Osterizer blender 4655-812/ Y 332VZ*, na velocidade média, até que 75% da quantidade triturada passassem através de uma peneira de 0,85 mm. O tempo total de trituração foi de 14 min, mas foram realizadas pausas de 1 min a cada 4 min de trituração.

Foram misturados 20 g de milho triturado com 100 mL de solução de extração metanol/água (70/30 % - V/V), no caso das amostras em que se esperava contaminação de aflatoxina entre 4 e 40 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, e 5 g de milho triturado foram misturados com 100 mL de solução de extração metanol/ água (70/30 % - V/V), no caso das amostras em que se esperava contaminação maior que 40 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, isto para que os resultados se enquadrassem na faixa de quantificação do método de ELISA utilizado, conforme descrito no item 3.6.1. A mistura foi agitada, vigorosamente, durante 3 min e seguidamente deixada em repouso por 15 min, para decantação. O extrato foi filtrado, com papel de filtro qualitativo nº 1. Como a condição excessivamente alcalina ($\text{pH} > 8$) ou ácida ($\text{pH} < 6$) podia afetar o resultado da análise de micotoxina, o pH do filtrado foi medido, em peagâmetro *Quimis*®, e quando esse se encontrava fora da faixa de 6 a 8, gotas de NaOH ou HCl a 0,1 N foram adicionadas para adequá-lo a estes valores. O extrato filtrado foi armazenado em câmara incubadora BOD a 5°C até o momento da análise com o Kit ELISA.

A descrição das etapas da análise para quantificação da aflatoxina total nas amostras de milho foi descrita no item 3.6.1 de acordo as informações contidas no manual do Kit ELISA AgraQuant® Determinação de Aflatoxinas Totais 4/40 (ROMER LABS, 2007).

4. RESULTADOS

4.1. Crescimento de *A. flavus* acompanhado em intervalos regulares de 24h, durante 14 dias, no meio YES

Durante os 14 dias de armazenamento, não foi observado crescimento de *A. flavus* nas temperaturas de 3 e 10 °C. Nas temperaturas de 15 e 42 °C, o diâmetro de crescimento da colônia atingiu 47 e 34 mm, respectivamente. Observou-se na colônia armazenada a 42 °C que o crescimento foi paralisado a partir do nono dia de incubação.

Nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C o diâmetro de crescimento foi acentuado (81 mm) atingindo a borda da placa de Petri no décimo, no sexto e no quarto dia de incubação, respectivamente. Assim, o efeito da temperatura sobre o crescimento deste fungo foi analisado no quarto dia de incubação.

4.2. Efeito da temperatura no crescimento de *A. flavus* no meio YES

Na Figura 7 pode-se observar o efeito das temperaturas testadas (3, 10, 15, 20, 25, 30 e 42 °C) sobre o crescimento de *Aspergillus flavus*, incubado durante 4 dias no meio YES com a_w de 0,98, e o desvio-padrão devido as 4 repetições.

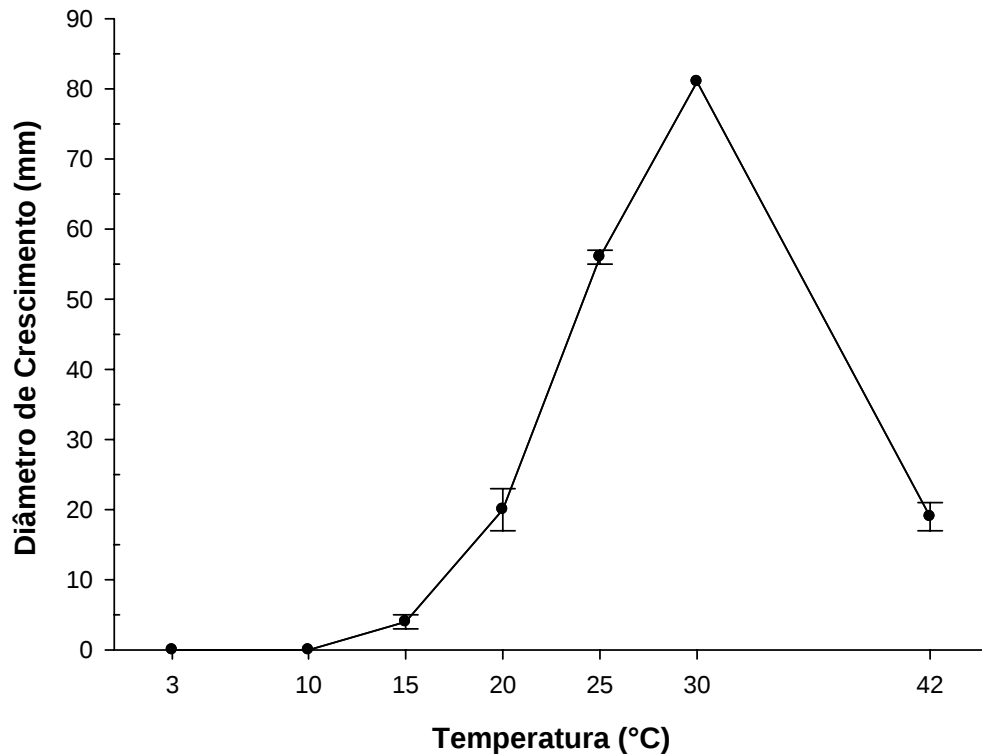


Figura 7. Média de crescimento de *Aspergillus flavus*, incubado durante 4 dias em meio de cultura artificial YES, nas temperaturas de 3, 10, 15, 20, 25, 30 e 42 °C. A barra de erro representa o desvio-padrão das 4 repetições de cada tratamento.

Notou-se que, entre as temperaturas testadas (3, 10, 15, 20, 25, 30 e 42 °C), o microrganismo foi capaz de crescer nas temperaturas de 15, 20, 25, 30 e 42 °C atingindo 4, 20, 56, 81 e 19 mm, respectivamente.

4.3. Determinação da produção de aflatoxina total (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) no meio YES

Os resultados médios para a produção de aflatoxina total (B_1 , B_2 , G_1 e G_2), em $\mu\text{g.kg}^{-1}$, por *A. flavus* incubado em meio de cultura YES, durante 14 dias, nas temperaturas de 3, 10, 15, 20, 25, 30 e 42 °C, estão apresentados na Tabela 3 e na Figura 8.

Tabela 3. Produção média de aflatoxina total (B_1 , B_2 , G_1 e G_2), em $\mu\text{g.kg}^{-1}$, por *A. flavus* incubado no meio de cultura YES, durante 14 dias, em diferentes temperaturas

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Média da produção de AFT ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Desvio- Padrão
3	ND*	-
10	ND	-
15	ND	-
20	ND	-
25	8,7	5,9
30	10,3	3,5
42	ND	-

*ND = não detectado

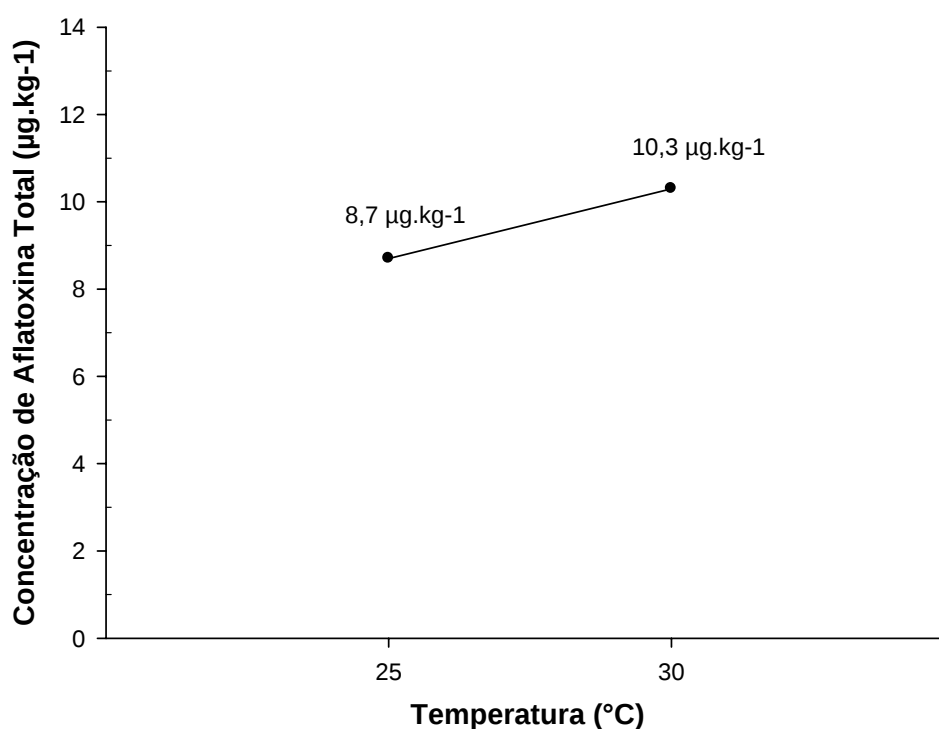


Figura 8. Média da produção de aflatoxina total (B_1 , B_2 , G_1 e G_2), em $\mu\text{g.kg}^{-1}$, por *A. flavus* incubado em meio de cultura YES, durante 14 dias, nas temperaturas de 25 e 30 $^{\circ}\text{C}$.

Observou-se que entre as temperaturas testadas o fungo, incubado durante 14 dias, só foi capaz de produzir aflatoxina a 25 $^{\circ}\text{C}$ e a 30 $^{\circ}\text{C}$, no meio de cultura YES com a_w de 0,98.

O meio de cultura contido nas placas de Petri que não foram inoculadas não apresentou aflatoxina total detectada, confirmando que o meio YES formulado não continha aflatoxinas B₁, B₂, G₁ ou G₂.

4.4. Determinação do teor de água dos grãos de milho

Na Tabela 4 encontram-se os valores médios do teor de água após esterilização; do teor de água calculado para o armazenamento em cada temperatura e dos teores de água determinados no início e no fim do armazenamento durante 14 dias.

Tabela 4. Temperatura e valores médios dos teores de água (% b.u.) dos grãos de milho

Temperatura (°C)	Após esterilização	Teor de água – (% b.u.)				
		Calculado	Armazenamento			
			Início	Fim	Média	DP*
3 **	10,6	20,7	21,1	18,7	19,9	1,7
10**	10,6	20,2	20,1	18,9	19,5	0,8
15**	10,6	19,8	19,5	18,3	18,9	0,8
20**	10,6	19,4	19,3	17,8	18,5	1,1
25**	10,6	19,0	17,1	20,8	19,0	2,6
30**	10,6	18,7	18,8	18,1	18,4	0,5
42**	10,6	18,1	18,0	12,9	15,4	3,6
15***	10,6	14,9	14,7	14,8	14,7	0,1

* DP = desvio-padrão.

** Amostra armazenada com teor de água de equilíbrio correspondendo a um ambiente de armazenamento com umidade relativa de equilíbrio de 90 %.

*** Amostra armazenada a 15 °C com teor de água de equilíbrio correspondendo a um ambiente de armazenamento com umidade relativa de equilíbrio de 70 %.

Pode-se observar que o teor de água determinado no início do armazenamento correspondeu, aproximadamente, ao teor de água calculado, exceto para a amostra armazenada a 25 °C, que variou em 1,9 pontos percentuais.

O teor de água determinado ao final dos 14 dias, em ambiente com 90 % de umidade relativa de equilíbrio (UR_{eq}) do ar, variou em relação ao valor inicial em 0,7 pontos percentuais na temperatura de 30 °C; em 1,2 pontos percentuais a 10 e 15 °C; em 1,5 pontos percentuais a 20 °C; em 2,4 pontos percentuais a 3 °C; em 3,7 pontos percentuais a 25 °C e em 5,1 pontos percentuais a 42 °C.

Em ambiente com 70 % de UR_{eq} do ar, essa variação foi de 0,1 pontos percentuais a 15 °C.

4.5. Avaliação do crescimento fúngico nos grãos de milho

Na Tabela 5 encontra-se a porcentagem de amostras nas quais houve crescimento visual de *A. flavus* em grãos de milho armazenados por 14 dias, com 4 repetições.

Tabela 5. Porcentagem de amostras em que se observou crescimento visual de *A. flavus* em grãos de milho armazenados em diferentes temperaturas durante 14 dias, com 4 repetições

Temperatura (°C)	Média do teor de água (% b.u.)	Crescimento visual (%)
3*	19,9	0
10*	19,3	0
15*	18,9	0
20*	18,5	100
25*	19,0	100
30*	18,4	100
42*	15,4	50
15**	14,7	0

* Amostra armazenada com teor de água de equilíbrio correspondendo a um ambiente de armazenamento com umidade relativa de equilíbrio de 90%.

**Amostra armazenada a 15 °C com teor de água de equilíbrio correspondendo a um ambiente de armazenamento com umidade relativa de equilíbrio de 70 %.

A formação de hifas e, ou, a presença de conídios de *A. flavus* ao redor dos grãos de milho armazenados, a 90 % de umidade relativa de equilíbrio do ar, não foram observadas visualmente nas temperaturas de 3, 10 e 15 °C, mas foram observadas nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C em todas as amostras avaliadas e a 42 °C em metade das amostras.

Para o ambiente a 70 % de umidade relativa de equilíbrio do ar, observou-se que não houve formação de hifas e, ou, presença de conídios de *A. flavus* a 15 °C.

Na Figura 9, encontra-se o crescimento visual de *A. flavus* nas amostras de milho no início e no final do armazenamento durante 14 dias em ambiente com umidade relativa de equilíbrio do ar de 90 %, nas temperaturas de 20, 25, 30 e 42 °C.

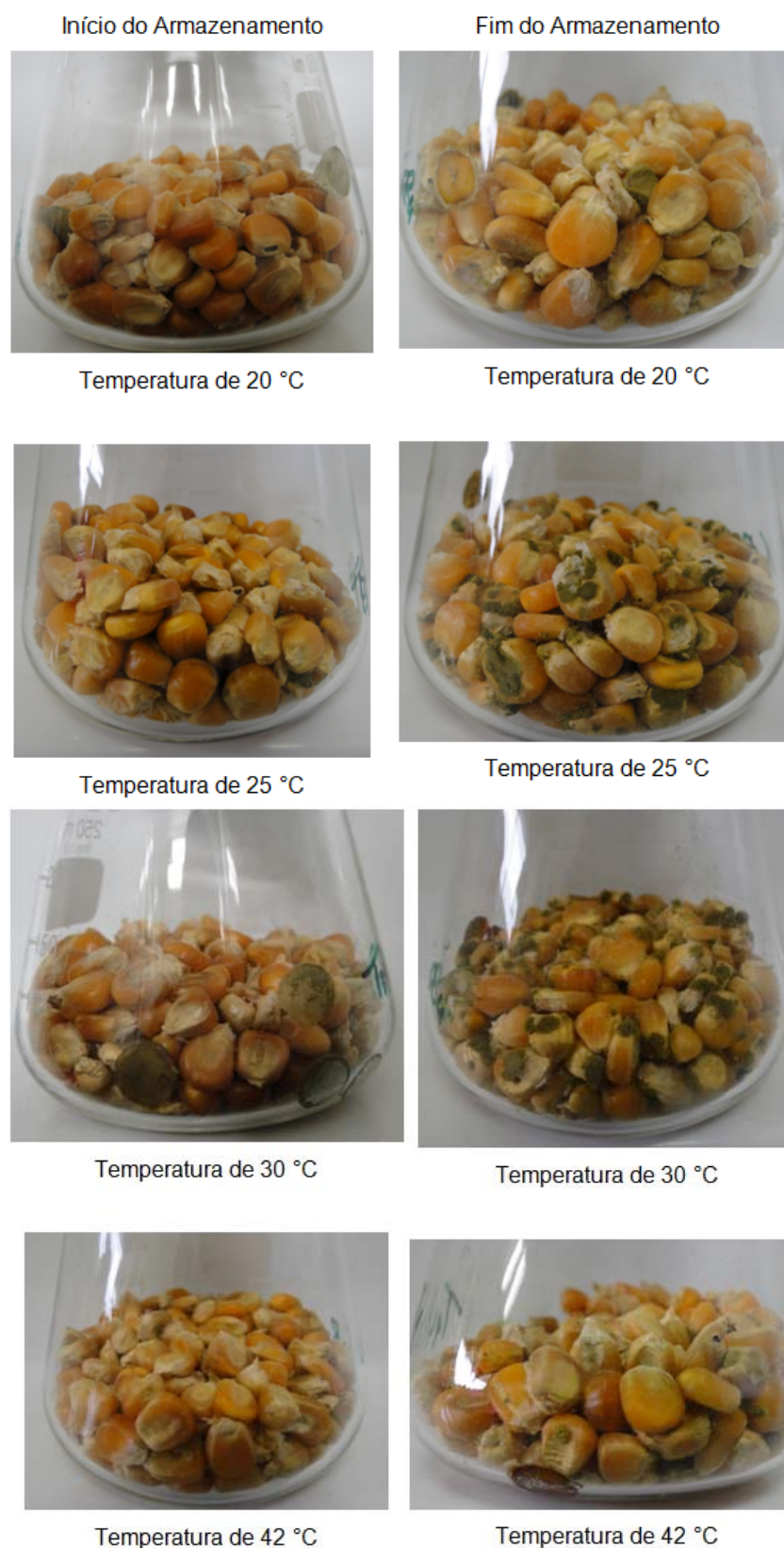


Figura 9. Crescimento visual de *A. flavus* em grãos de milho armazenados por 14 dias, em ambiente com umidade relativa de equilíbrio de 90%, nas temperaturas de 20, 25, 30 e 42 °C.

4.6. Determinação da aflatoxina total (B₁, B₂, G₁ e G₂) nos grãos de milho

Na Tabela 6 e na Figura 10, encontram-se os resultados da análise de aflatoxina total em grãos de milho armazenados durante 14 dias em ambiente com umidade relativa de equilíbrio (UR_{eq}) do ar de 90%, nas temperaturas de 3, 10, 15, 20, 25, 30 e 42 °C, e em ambiente com umidade relativa de equilíbrio do ar de 70% na temperatura de 15 °C.

Tabela 6. Produção média de aflatoxina total (B₁, B₂, G₁ e G₂) por *A. flavus*, em µg.kg⁻¹, em grãos de milho armazenados em diferentes temperaturas, durante 14 dias, com 4 repetições

Temperatura (°C)	Média da produção de AFT (µg.kg ⁻¹)	Desvio-Padrão
3*	ND***	-
10*	ND	-
15*	4,6	5,6
20*	899,2	521,8
25*	5.104,0	1.278,2
30*	5.654,0	660,8
42*	63,7	35,5
15**	11,6	6,5

* Amostra armazenada com teor de água de equilíbrio correspondendo a um ambiente de armazenamento com umidade relativa de equilíbrio de 90 %.

** Amostra armazenada a 15 °C com teor de água de equilíbrio correspondendo a um ambiente de armazenamento com umidade relativa de equilíbrio de 70 %.

*** ND = não detectado.

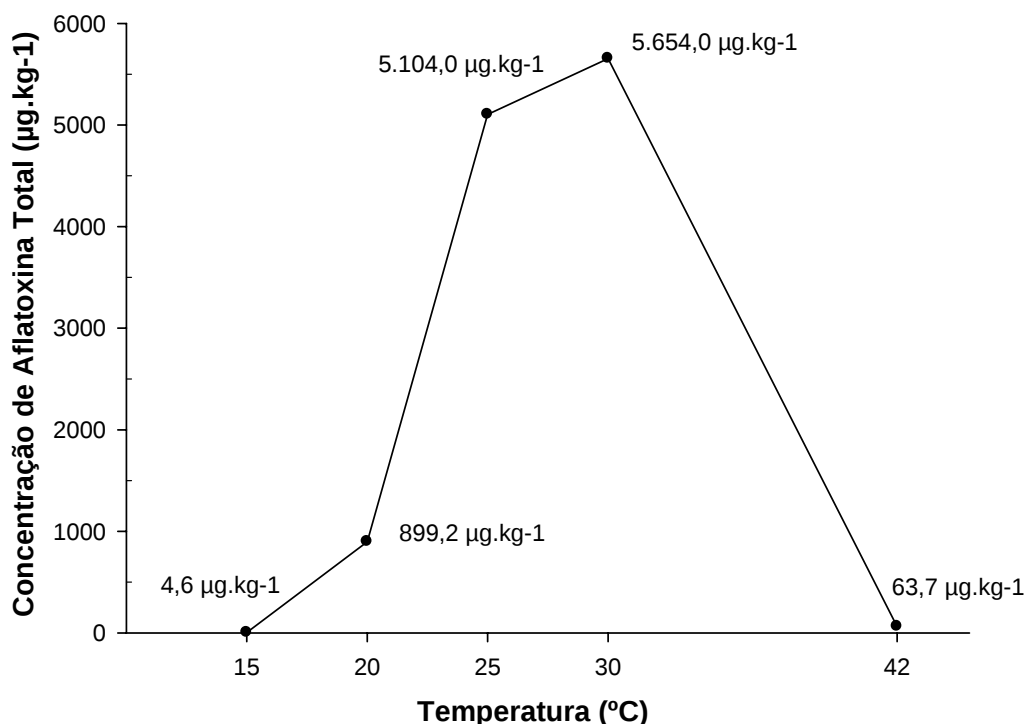


Figura 10. Valores médios da produção de aflatoxina total (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) por *A. flavus*, em $\mu\text{g.kg}^{-1}$, em grãos de milho armazenados em diferentes temperaturas, durante 14 dias, em ambiente com umidade relativa de equilíbrio do ar de 90 %.

Pôde-se observar que não foi detectada presença de aflatoxina em grãos de milho armazenados em ambiente com 90 % de UR_{eq} e atividade de água de, aproximadamente, 0,9, nas temperaturas de 3 e 10 °C, mas houve quantificação de aflatoxina total nas temperaturas de 15, 20, 25, 30 e 42 °C.

Nos grãos de milho armazenados a 15 °C e no ambiente a 70% UR_{eq} do ar foi detectada aflatoxina total num valor de $11,6 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

Os grãos de milho contidos nos frascos que não foram inoculados não apresentaram aflatoxina total (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) detectada, confirmando que o milho utilizado não continha as aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 ou G_2 .

5. DISCUSSÃO

Nas condições testadas neste trabalho, o crescimento do microrganismo *A. flavus* no meio de cultura YES foi maior a 30 °C (Figura 7), o que está de acordo com a maioria dos trabalhos realizados, independentemente do meio testado, conforme demonstrado por Marin et al. (1998), que relataram que a temperatura ótima de crescimento, em meio de extrato de milho, foi de 30 °C ; por Sautour et al. (2001a,b), que estimaram a temperatura ótima de 31 °C em meio BDA, e por Hussein & Brasel (2001), que determinaram a faixa de temperatura ótima sendo de 25 a 30 °C.

Nas temperaturas de 3 e 10 °C não houve detecção de aflatoxina total (B₁, B₂, G₁ e G₂) no meio YES, o que pode se explicado pelo o fato do *A. flavus* não ter se desenvolvido nessas temperatura. Estas observações estão de acordo com BULLERMAN et al. (1984), que afirmaram que a produção de toxina está ligada ao crescimento do fungo: sem o crescimento a produção não ocorre, porém com crescimento a produção pode ou não ocorrer. O que também pôde ser notado neste trabalho, uma vez que, o *A. flavus* foi capaz de crescer nas temperaturas de 15, 20 e 42 °C, mas não de produzir aflatoxina (Tabela 3).

Entre as temperaturas em que houve produção de aflatoxina total no meio YES (figura 8), a de 30 °C apresentou a maior produção, o que está de acordo com o observado por Gqaleni et al. (1997), que concluíram que a temperatura ótima para produção de aflatoxina foi a de 30 °C, no meio YES, nas atividades de água de 0,9; 0,95 e 0,996 durante 15 dias de incubação. Entretanto, nesta pesquisa não foi detectada aflatoxina total a 20 °C, no meio YES, o que difere do observado por Gqaleni et al. (1997), que observaram produção desta toxina a 20 °C no meio YES em a_w de 0, 95 e 0, 996; e por Ritter (2007), que analisou as temperaturas de 20, 25, 30, 35 e 40°C no meio YES, em diferentes valores de pH e tempo, e observou que apenas as temperaturas de 20 e 25°C mostraram-se propícias para a produção de aflatoxina B₁.

Analisando-se as médias dos teores de água inicial e final e seus respectivos desvios-padrões (tabela 4) para cada temperatura de armazenamento, pode-se observar que os desvios apresentaram valores

baixos (entre 0,5 e 1,7), o que indica que os valores dos teores de água se mantiveram praticamente constantes durante os 14 dias de armazenamento, garantindo assim o armazenamento em ambiente a 90% de umidade relativa de equilíbrio (UR_{eq}). Para a temperatura de 15 °C em ambiente a 70 % de UR_{eq} do ar, o desvio-padrão também foi baixo (0,1), o que garantiu o armazenamento nesse valor de UR_{eq} .

Para as temperaturas de 25 e 42 °C, os desvios-padrões foram um pouco mais elevados (tabela 4). Na temperatura de 25 °C observou-se que o valor do teor final de água diferiu apenas em 1,8 pontos percentuais do valor calculado, o que pode indicar que no momento em que o teor inicial de água foi determinado as amostras ainda não estavam completamente homogêneas, assim pode-se admitir que o armazenamento a 90% de UR_{eq} foi garantido. Para a temperatura de 42 °C a diferença de 5,1 pontos percentuais entre os teores de água do início e do fim do armazenamento pode ser explicado porque houve grande perda de água dos grãos para o ambiente de armazenamento, demonstrando que a UR_{eq} de 90 % não foi mantida constante ao longo dos 14 dias de armazenamento.

Na temperatura de 42 °C, a formação de hifas e, ou, a presença de conídios de *A. flavus* (tabela 5) em apenas metade das amostras de milho podem ser explicadas pela diminuição do teor de água de 18,0 % (b.u.) para 12,9 % (b.u.) (tabela 4) ao longo do armazenamento, o que reduziu a água disponível para o desenvolvimento do fungo *A. flavus*. De acordo com Moss (1991), o crescimento de *A. flavus* ocorre em atividade de água mínima de 0,80, a qual é observada em grãos de milho com teor de água de 16 % (b.u.). Isto também reforça o fato de não terem sido observadas a formação de hifas e, ou, a presença de conídios a 15 °C, em ambiente com UR_{eq} de 70 % (tabela 5), uma vez que o teor de água médio entre o início e o fim do armazenamento foi de 14,7 % (b.u.) (tabela 4).

Nas condições deste experimento, verificou-se que nas temperaturas de 25 e 30 °C a produção de aflatoxina total em grãos de milho foi bastante elevada (tabela 6) confirmando o encontrado por muito pesquisadores. Segundo Diener & Davis (1966) a produção máxima de aflatoxina, em cereais, ocorreu em teor de água de 25 % (b.u.) a 30 °C, sendo que a faixa de umidade relativa mínima exigida foi de 83 a 88 % e houve aumento na produção de

aflatoxina com o acréscimo da umidade relativa para 99 %. Leeson et al. (1995) descreveram que umidade relativa de 80 a 85 %, teor de água de 17% (b.u.) e temperatura entre 24 e 35 °C são condições ótimas para a produção de aflatoxinas em cereais.

Segundo ICMSF (1996), a faixa de temperatura para a produção de aflatoxina é de 13 a 37 °C. Entretanto, verificou-se nesta pesquisa que houve produção de aflatoxina total na temperatura de 42 °C.

A quantificação de aflatoxina total em grãos de milho a 15 °C (tabela 6), em ambiente com UR_{eq} de 70% e com atividade de água (a_w) de, aproximadamente, 0,7, neste trabalho, provavelmente não se refere à presença desta toxina, pois segundo Beauchat (1981), Bullerman et al. (1984) e Mallozzi & Corrêa (1998) a faixa mínima de atividade de água necessária para o crescimento de *A. flavus* é de 0,78 a 0,80 e a faixa mínima para a produção de micotoxina é de 0,83 a 0,87.

O valor detectado de aflatoxina total pode ser atribuído à pequena alteração de cor que o milho pode ter sofrido ao ser autoclavado, pois a técnica de Elisa utiliza um espectrofotômetro para determinação da absorbância da amostra, assim qualquer alteração na cor da amostra pode ser interpretada como presença ou ausência de toxina.

6. CONCLUSÕES

Para as condições experimentais conclui-se que:

- a) o *Aspergillus flavus* é capaz de se desenvolver em diferentes temperaturas no meio YES;
- b) a capacidade de produção de aflatoxina total por *A. flavus* é maior na temperatura de 30°C, no meio YES;
- c) em grãos de milho, o *A. flavus* é capaz de se desenvolver em diferentes temperaturas para o mesmo valor de umidade relativa de equilíbrio;
- d) a capacidade de produção de aflatoxina total por *A. flavus*, em grãos de milho, é maior na temperatura de 30°C, para ao mesmo valor de umidade relativa de equilíbrio; e
- e) em grãos de milho, a capacidade de produção de aflatoxina total por *A. flavus* não atingiu níveis críticos, conforme a literatura, quando o milho foi armazenado na temperatura de 15 °C, umidade relativa de equilíbrio de 70 % e teor de água de 14,7 % (b.u.).

7. BIBLIOGRAFIA

ACASIO, A. **Handling and storage of soybeans and soybean meal**. Manhattan, 1997. 17 p.

AMADO, M. A. Métodos imunológicos na detecção e determinação de aflatoxinas em alimentos: vantagens e inconvenientes. Repositório Científico do Instituto Politécnico de Viseu. **Revista Millenium**, n. 26, ISSN: 1647-662X, Jul. 2002.

AMARAL, K. A. S. do; NASCIMENTO, G. B.; SEKIYAMA, B. L.; JANEIRO, V.; MACHINSKI, JR. 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.

BARNA-VETRO, I. et al. Sensitive ELISA Test for determination of ochratoxin A. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, p. 4071-4074, 1996.

BERGERE, J. L. Techniques d'analyse immunochimiques. In: **Techniques d'analyse et contrôle dans les Industries Agro-Alimentaires**. Linden G. Goord. Paris: Abr. 1991. p. 343-370.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 274, da ANVISA, de 15/10/2002. Publicada no Diário Oficial da União, de 16 de outubro de 2002. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/274_02rdc.htm>. Acesso em: 28 mar. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria MA/SNAD/SFA Nº. 07, de 09/11/88. Publicada no Diário Oficial da União de 09 de novembro de 1988 - Seção I, p. 21968, 1988.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução n.34/76 da Comissão Nacional de Normas e padrões para alimentos. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos. Publicada no Diário Oficial da União, em 19 de janeiro de 1977 - Seção I, p. 710, 1977.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análises de Sementes**. Brasília, DF: MAPA, 2009. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/images/MAPA/arquivos_portal/ACS/sementes_web.pdf>. Acesso em: 18 mar. 2010.

BEAUCHAT, L. R. Microbial stability as affected by water activity. **Cereal Food World**. n. 26, p. 345-349, 1981.

BROOKER, D.B.; BAKKER-ARKEMA, F.W.; HALL, C.W. **Drying and storage of grains and oilseeds**. Westport: The AVI Publishing Company, 1992. 450 p.

BULLERMAN, L.B.; SCHROEDER, L.L.; PARK, K.Y. **Formation and control of mycotoxins in food**. *J. Food Prot.*, v. 47, n. 8, p. 637-646, 1984.

CHU, F. S. **Recent studies on immunoassays for mycotoxin**. In: **BEIER R. C.; STANKER, L. H. (Ed.)**. Immunoassays for residue analysis. Washington, DC: American Chemical Society, 1998. p. 294-313.

CORRÊA, P. C.; JÚNIOR, P. C. A.; RIBEIRO, D. M.; SILVA, F. Equilíbrio higroscópico de milho, alpiste e painço: Obtenção e modelagem. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, n. 1, p. 162-167. 2006.

CHRISTENSEN, C.M.; KAUFMANN, H.H. MICROFLORA. In: CHRISTENSEN, C.M. **Storage of cereal grain and their products**. St. Paul: American Association of Cereal Chemists, p. 158-192, 1974.

DESHPANDE, S.S. **Handbook of food toxicology**. Nova York: Ed CRC Press, 2002. 903 p.

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

DIENER, U. H.; DAVIS, N. D. Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*. **Phytopathology**, v. 56, p. 1390-1393, 1966.

EMBRAPA MILHO E SORGO. **Sistemas de Produção**, 2. ISSN 1679-012X
Versão Eletrônica - 5ª edição. Set./2009. Disponível em:
<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/economia.htm>.
Acesso em: 25 jan. 2011.

FANCELLI, A. L., DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária Ltda., 2000. 360p.

FERREIRA, H.; PITTNER, E.; SANCHES, H. F.; MONTEIRO, M. C. Aflatoxinas: um risco à saúde humana e animal. **Ambiência - Revista do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais**, Guarapuava, PR, v. 2, n. 1, p. 113-127 jan./jun. 2006. Disponível em:
<<http://www.unicentro.br/EDITORIA/REVISTAS/AMBIENCIA/v2n1/9-Revis%E3o%20Biblio%20-%20Aftatoxinas...pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2010.

FRAGA, M. E.; SILVA, F. O.; CORRÊA, T. B. S.; COSTA, R. A.; FARIAS, A. X. Fungos Potencialmente Ocratoxígenos em Café. Documentos 53. Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **EMBRAPA**. ISSN 0103-6068. Outubro, 2003. Disponível em: <<http://www.ctaa.embrapa.br/publicacao/upload/doc53-2003.pdf>>. Acesso em: 27 jan. 2011.

GILBERT J.; VARGAS, E. A. **Advances in Sampling and Analysis for Aflatoxins and Animal Feed**. Journal of Toxicology - Toxin Reviews, New York, v. 22, p. 381-422, 2003.

GODOI, M. J. S. **Utilização de aditivos em rações, formuladas com milho normal e de baixa qualidade, para frangos de corte.** 2005. 51 f. Tese (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

GONELI, A. L. D.; CORRÊA, P. C.; RESENDE, O.; NOGUEIRA, B. L.; BOTELHO, F. M. Modelagem matemática do equilíbrio higroscópico dos grãos de arroz em casca obtido pelos métodos estático e dinâmico. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa MG, v. 32, n. 2, p. 152-260, 2007.

GOURAMA, H.; BULLERMAN, L. B. ***Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: a review.** Journal of Food Protection, v. 58, n. 12, p. 1395-1404, Dez. 1995.

GQALENI, N.; SMITH, J. E.; LACEY, J.; GETTINBY, G. Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 1048–1053, Mar. 1997.

GUO, B.; CHEN, Z. Y.; LEE, R. D.; SCULLY, B. T. Drought stress and preharvest aflatoxin contamination in agricultural commodity: genetics, genomics and proteomics. **Journal Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 10, p. 1281-1291, Out. 2008.

HALL, C. W. **Drying and storage of agricultural crops.** Westport: The AVI Publishing Company, 1980. 382 p.

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

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxin on humans and animals. **Toxicology**, Amsterdam, v. 167, p. 101-134, 2001.

JAIMEZ, J.; FENTE, C. A.; VAZQUEZ, B. I.; FRANCO, C. M.; CEPEDA, A.; MAHUZIER, G.; PROGNON, P. Review: Application of the assay of aflatoxins

by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of Chromatography** , v. 882, p.1-10, 2000.

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganismos de los alimentos: características de los patógenos microbianos**. Zaragoza: Acribia, 1996. p. 403-428.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Tradução Eduardo Cesar Tondo et al. – 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

JULIAN, A. M., WAREING, P. W., PHILIPS, S. I., MEDLOCK, V. F. P., MACDONALD, M. V., RÍO, L. E. Fungal contamination and selected mycotoxins in pre- and post-harvest maize in Honduras. **Mycopathologia**, v. 129, n. 1, p. 5-16, 1995.

KUIPER-GOODMAN, T. Mycotoxins: risk assessment and legislation. **Toxicology Letters**, v. 82/ 83, p. 853-859, 1995.

LEESON, S., GONZALO, J. D .G., SUMMERS, J. D. **Poultry disorders and mycotoxins**. Ontário, Canadá: Guelph, 1995. 350 p.

LÚCIO, C. H.; PINTO, N. F. J.; MARRIEL, I. E. **Otimização do método de Elisa indireto não-competitivo para detecção e quantificação de aflatoxina B1 em cereais**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Comunicado Técnico 152. ISSN 1679-0162. Sete Lagoas, MG. Dezembro, 2007.

MALLOZZI, A. B.; CORRÊA, B. Fungos Toxigênicos e Micotoxinas. **Boletim Técnico Instituto Biológico**, São Paulo, n.12, p. 5-26, 1998.

MARASAS, W. F. O. Fumonisin: history, world-wide occurrence and impact. In: JACKSON, L. S., DELVRIES, J. W., BILLERMAN, L. B. (Ed.), **Fumonisin in food**. New York: Plenum Press, 1996. p. 1-17.

MARIN, S.; SANCHIS, V.; SA´ENZ, A. J.; RAMOS, I.; MAGAN, N. Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from corn grain. **Journal of Applied Microbiology**, ISSN 1364-5072, v. 84, n. 1, p. 25-36, 1998.

MOLINA, M.; GIAMUZZI, L. Modelling of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. **Food Research International**, London, v. 35, p. 585-594, 2002.

MOSS, M. O. Mycology of cereal grain and cereal products. In: CHELKOWSKI, J. **Cereal grain: mycotoxins, fungi and quality in drying and storage**. Amsterdam: Elsevier Science, 1991. cap. 2, p. 23-52.

MURPHY, P. A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C. M. Food Mycotoxins: An Update. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 5, 2006.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiología Médica**. Elsevier España, 2006. 5. ed. 976 p.

OSBORNE, B. G. Mycotoxins and the cereals industry - a review. **International Journal of Food Science & Technology**, 1982. v. 17, p. 1-9.

NILES, E. V., NORMAN, J. A., PIMBLEY, D. Growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* on wheat and barley. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 84, p. 259-66, Mar. 1985.

PADÍN, S.; BELLO, G. D.; FABRIZIO, M. Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelides obtectus* in stored durum wheat and beans treated with *Beauveria bassiana*. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 38, p. 69-74, 2002.

PERAICA, M.; DOMIJAN, A. M.; JURJEVIC, Z.; CVJETKOVIC, B. Prevention of exposure to mycotoxins from food and feed. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 53, p. 229-237, 2002.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P. de; PRADO, G. **Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus***. Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, Curitiba, v. 20, n. 1, jan./jun. 2002.

PFOST, H. B.; MAURER, S. G.; CHUNG, D. S.; MILLIKEN, G. **Summarizing and reporting equilibrium moisture data for grains**. Saint Joseph: ASAE, 1976. 11 p. (Paper, 76-3520)

PITT, J. I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British Medical Bulletin**, v. 56, p. 184-192, 2000.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. London: Blackie Academic & Professional. 1997. 593p.

RAMAKRISHNA, N.; LACEY, J.; SMITH, J. E. *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxin B1 formation in barley grain during interactions with other fungi. **Mycopathologia**, v. 136, p. 53-63, 1996.

RAMAKRISHMA, N.; MEHAN, V. K. **Direct and indirect competitive monoclonal antibody- based ELISA of Aflatoxin B1 in groundnut**. n. 1, p. 53-63, 1993.

REDAÇÃO. Micotoxinas estão presentes em 25% dos grãos. **Avicultura Industrial**, São Paulo, 06 mar. 2002. Disponível em: <<http://www.aviculturaindustrial.com.br/PortalGessulli/WebSite/Noticias/bmicotoxinabs-estao-presentes-em-25-dos-graos,1497.aspx>>. Acesso em: 18 fev. 2010.

RESENDE, O.; CORRÊA, P. C.; GONELI, A. L. D.; RIBEIRO, D. M. Isotermas e Calor Isostérico de Sorção do Feijão. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 626-631. 2006.

RICHARD, J. L.; PAYNE, G. A. et al. **Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems**. p. cm. -- (Task force report, ISSN 0194-4088 ; n. 139). Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA, 2003.199p.

RIGUEIRA, R. J. A. **Avaliação da qualidade do café processado por via úmida, durante as operações de secagem e armazenagem**. 2005. 76 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

RITTER, A. C. **Potencial toxigênico de *Aspergillus flvaus* testado em diferentes meios e condições**. 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande Do Sul - Faculdade De Agronomia, Porto Alegre, RS.

RODOVALHO, R. S. **Determinação e modelagem matemática das isotermas de Sorção do arroz-vermelho (*oryza sativa* L.)**. 2008. 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual de Goiás, Anápolis. GO.

ROMER LABS SINGAPORE PTE LTD. **Agraquant® Determinação De Aflatoxinas Totais 4/40. Order #: COKAQ1000**. Ano 2007.

SABINO, M. Micotoxinas em Alimentos. In: OGA, S. (ed.) **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu Editora, p. 461-472, 1996.

SANTIN, E. Micotoxicoses. In: **Doenças de aves**. Editado por BERCHIERI JR., A., MACARI, M. Campinas: FACTA, 2000. p. 379-388.

SAUTOUR, M.; DANTIGNY, P.; DIVIES, C.; BENSOUSSAN, M. A temperature-type model for describing the relationship between fungal growth and water

activity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 63-69. July 2001a.

SAUTOUR, M.; ROUGET, A.; DANTIGNY, P.; DIVIES, C.; BENSOUSSAN, M. Application of Doehlert design to determine the combined effects of temperature, water activity and pH on conidial germination of *Penicillium chrysogenum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 900-906. Nov 2001b.

SCOTT, W. J. Water relation of food spoilage microorganisms. **Advances in Food Research**, v. 7, p. 83-127, 1957.

SCUSSEL, V. M. Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos. In: HIROOKA, E. Y (Ed.). **Fumonisin**. Organizado e editado por Vildes Maria Scussel. Florianópolis: Editora da autora, 2000. p. 22-24.

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

SCUSSEL, V. M. **Estudo da incidência de aflatoxinas em amendoim (*Arachis hypogae* L.), milho (*zea mays* L.) e produtos derivados**. 1984. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

SILVA, J. S. Secagem e armazenagem de produtos agrícolas. In: CORRÊA, P. C.; SILVA, J. S. (Ed.). **Estrutura, composição e propriedades dos grãos**. 2 ed. Viçosa: Aprenda Fácil, 2008a. cap. 2, p. 22.

SILVA, J. S. Secagem e armazenagem de produtos agrícolas. In: SILVA, J. S.; BERBERT, P. A.; RUFATO, S.; AFONSO, A. D. L. (Ed.). **Indicadores da qualidade dos grãos**. 2 ed. Viçosa: Aprenda Fácil, 2008b. cap. 4, p. 63-107.

SILVA, J. S. Secagem e armazenagem de produtos agrícolas. In: SILVA, J. S.; LACERDA FILHO, A. F. de; RUFFATO, S.; BERBERT, P. A (Ed.). **Secagem e**

Armazenagem de Produtos Agrícolas. 2 ed. Viçosa: Aprenda Fácil, 2008c. cap. 17, p. 417.

SOUZA, A. V. C. **Valor nutricional de grãos atacados por insetos ou contaminados por micotoxinas para frangos de corte.** 2003. 160 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

TANIWAKI, M. H.; FONSECA, H.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Variabilidade de produção de aflatoxinas por linhagens de *aspergillus flavus* em diferentes tempos de manutenção. **Scientia Agricola.** Piracicaba, v. 50, p. 140-150, fev./maio, 1993.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. da. **Fungos em alimentos: ocorrência e detecção.** Campinas: Núcleo de Microbiologia/ITAL, 2001. 82 p.

VILLA, L. G.; ROA, G. **Secagem e armazenamento da soja industrial e sementes a granel.** Campinas: Fundação Cargill, 1979. 64 p.

ZHENG, M. Z.; RICHARD, J. L.; BINDER J. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. **Mycopathologia,** The Hague, v. 161, p. 261-273, 2006.

ANEXOS

Anexo I

I. Resultado de aflatoxina do milho usado



RESULTADO DE ANÁLISE LABORATORIAL MLCV-10039019

CLIENTE:	Universidade Federal de Viçosa	DATA ENTRADA:	11-11-2010
ENDEREÇO:	Av. Peter Henry Rolfs s/n, 36570-000. Viçosa- MG	DATA SAÍDA:	16-11-2010
MATERIAL ENVIADO:	Milho		
ANÁLISE(S) SOLICITADA(S):	Detecção de Micotoxina (Aflatoxina)		

PROTOCOLO MERCOLAB	IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA (conforme dados do cliente)	RESULTADO
		Aflatoxina (ppb)
MLCV-10035505	Milho II, Diana Paris UFV, 04/11/10	Não detectado.
TOTAL DE AMOSTRAS : 1		

Comentários :

Peso da amostra recebida: 1000g

Técnica: ELISA direto por competição.

Método: ELISA - AgraQuant, Romer Labs, Singapore Pte Ltd.

Condições de Análise: Temperatura controlada (18-30°C).

Níveis máximos em grãos: Aflatoxina: 20ppb (Regulamento (CE) 1126/2007).

Alberto Back, Med. Vet, MS, PhD
Responsável Técnico CRMV - PR 5115

Cascavel, terça-feira, 16 de novembro de 2010.

_____ //

Os resultados referem-se apenas a amostra recebida e analisada nas condições descritas acima.
A reprodução deste documento só é permitida com autorização do cliente e do laboratório.
Laboratório Credenciado Junto ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
para Diagnóstico de Salmoneloses e Micoplasmoses Aviárias, Sob Portaria Nº 14, de 27 de Janeiro de 2009.

MERCOLAB LABORATÓRIOS LTDA
Rua Maringá 2388 - São Cristóvão - CEP 83816-260 - Cascavel - PR, CNPJ: 04557370/0001-09
FONE/FAX: (45) 3215-0000 / (45) 3227-0030 E-MAIL: mercolab@mercolab.com.br

Página 1 de 1