

**CELSO GRIGOLETTI**

**ASSOCIAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS NO CONTROLE DE FUNGOS EM  
GRÃOS DE MILHO ARMAZENADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia, Área de Concentração Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi  
Co-Orientadores: Prof. Dr. Edilberto Possamai e Prof. Dr. José Luciano Andriguetto

**CURITIBA - 2007**

**CELSO GRIGOLETTI**

**ASSOCIAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS NO CONTROLE DE FUNGOS EM  
GRÃOS DE MILHO ARMAZENADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia, Área de Concentração Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi  
Co-Orientadores: Prof. Dr. Edilberto Possamai e Prof. Dr. José Luciano Andriguetto

**CURITIBA - 2007**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
PRODUÇÃO VEGETAL


### PARECER

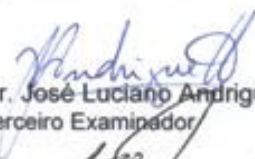
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO, apresentada pelo candidato **CELSO GRIGOLETTI**, sob o título "**ASSOCIAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS NO CONTROLE DE FUNGOS EM GRÃOS DE MILHO ARMAZENADOS**", para obtenção do grau de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.


Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Tese.

Curitiba, 24 de Setembro de 2007.

  
Professora Dra. Adriana Martinelli Seneme  
Primeira Examinadora

  
Professora Dra. Lucimeris Ruaro  
Segunda Examinadora

  
Professor Dr. José Luciano Andriguetto  
Terceiro Examinador

  
Professor Dr. Edilberto Possamai  
Quarto Examinador

  
Professor Dr. Luiz Antonio Biasi  
Presidente da Banca e Orientador

## DEDICATÓRIA

A Deus, todo poderoso, que ilumina  
todos os caminhos,  
Ao meu irmão, Renato Grigoletti, *in  
memorian.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao curso de Pós Graduação, Produção Vegetal, da Universidade Federal do Paraná por permitir ingressar no curso de Doutorado.

Ao amigo e orientador Professor Ph.D, Engenheiro Agrônomo, Edilberto Possamai por me aceitar como seu orientado no trabalho que nos propusemos desenvolver e que foi sempre solícito em todos os momentos de nossa pesquisa.

Ao orientador Professor Doutor, Engenheiro Agrônomo, Luiz Antonio Biasi, pela valiosa colaboração.

Ao Professor Co – Orientador Ph.D, Médico Veterinário, José Luciano Andriguetto, pelo coleguismo de muitos anos e que aceitou prontamente o nosso convite.

Ao Professor Doutor João Carlos Possamai, Engenheiro Agrônomo, pela orientação e dedicação na realização da estatística do trabalho.

Ao Professor Doutor Waldir Silva, Médico Veterinário, em contribuir com as fotografias do desenvolvimento de fungos do trabalho e também na parte de patologia da atividade fungica.

Ao Marcelo França, Médico Veterinário e Hair Ferrarini, Químico, que abriram as portas do Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootécnica da Universidade Federal do Paraná, sempre que foi preciso utilizar equipamentos do laboratório necessário a nossa pesquisa.

À Louise Cândido da Silva, Técnica do Laboratório de Ornitopatologia da Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio precioso e sempre solícito nos exames que foram necessários para a elaboração do material necessário para o desenvolvimento de nossa pesquisa.

Ao Laboratório de Ornitopatologia da Universidade Federal do Paraná, no uso do equipamento necessário a nossa pesquisa.

A todos os colegas da Pós Graduação pelo tempo que convivemos juntos e pela troca de experiências.

A secretaria do curso de Pós Graduação, Lucimara Antunes, que sempre estava pronta para esclarecimentos com relação ao curso.

A todos que me abriram as portas quando precisei de alguma orientação.

Minhas desculpas às pessoas que pensaram em alguma descortesia de minha parte.

A empresa ALLTECH, pelo patrocínio integral de nossa pesquisa e a todos os componentes que me auxiliaram em nossos pedidos, em especial a Andréa Malaguido, Engenheira Agrônoma, que não mediu esforços desde o nosso primeiro contato para desenvolver o teste.

Em 2004 ingressamos no curso de Doutorado, novos companheiros conquistamos, novos aprendizados foram importantes, dedicação e preocupações não faltaram, e por minha satisfação pessoal não vimos ou sentimos a presença de obstáculos que pudessem impedir os nossos objetivos no curso.

## BIOGRAFIA DO AUTOR

Celso Grigoletti, Médico Veterinário, formado pela Universidade Federal do Paraná em 1974, com especialização em Avicultura (manejo, produção e doenças de aves); 32 anos de experiência profissional, gerente técnico do Departamento de Aves da Cooperativa Central de Laticínios do Paraná (Produtos Batavo);

Curso de Patologia de Aves na Holanda em 1978, produção e doenças de aves na Arbor Acres Farms (EUA) em 1988;

Participante de vários cursos em Avicultura em nível nacional;

Mestrado em Ciências Veterinárias, concluído em março de 2002, com a dissertação *Sacharomyces cerevisiae* na Alimentação de Frangos de Corte;

Professor substituto da Universidade Federal do Paraná administrando aulas de Doenças de Aves no período de 2003 a 2005;

Aluno do curso de Pós Graduação Doutorado em Agronomia em 2004, com a pesquisa Associação de ácidos orgânicos no controle da contaminação de fungos em grãos de milho armazenados.

# SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| LISTA DE TABELAS.....  | vii       |
| LISTA DE FIGURAS.....  | ix        |
| LISTA DE ANEXOS.....   | x         |
| RESUMO.....  | xi        |
| ABSTRACT.....  | xii       |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>  | <b>4</b>  |
| 2.1 O MILHO E A PRODUÇÃO DE RAÇÕES.....  | 5         |
| 2.2 ASPECTOS SOBRE A ARMAZENAGEM DO GRÃO DE MILHO.....                           | 6         |
| 2.3 ALTERAÇÕES NO VALOR NUTRICIONAL DO MILHO.....                                | 7         |
| 2.4 AÇÃO DAS MICOTOXINAS.....  | 7         |
| 2.5 AÇÃO DAS AFLATOXINAS.....  | 13        |
| 2.6 CONTROLE DAS MICOTOXINAS.....  | 14        |
| 2.7 UTILIZAÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS NO CONTROLE DE FUNGOS.....                   | 17        |
| <b>3 METODOLOGIA.....</b>  | <b>19</b> |
| 3.1 LOCAL DE PESQUISA.....   | 19        |
| 3.2 MATERIAL UTILIZADO NA PESQUISA.....  | 19        |
| 3.3 ANÁLISE INICIAL DA AMOSTRA.....  | 19        |
| 3.3.1 Análise bromatológica.....   | 19        |
| 3.3.2 Análise para detecção de fungos e concentração de micotoxinas.....         | 19        |
| 3.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE GRÃO DE MILHO.....                                | 20        |
| 3.5 DETECÇÃO DE FUNGOS NOS GRÃOS DE MILHO.....                                   | 22        |
| 3.6 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE AFLATOXINAS.....                                  | 22        |
| 3.7 TRATAMENTOS E AVALIAÇÃO.....   | 22        |
| 3.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                         | 24        |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>   | <b>25</b> |
| 4.1 EXAME BROMATOLÓGICO ENVOLVENDO UMIDADE, PROTEÍNA BRUTA E EXTRATO ETÉREO..... | 25        |
| 4.1.1 Umidade.....   | 25        |
| 4.1.2 Proteína bruta.....  | 27        |
| 4.1.3 Extrato etéreo.....  | 27        |
| 4.2 DETECÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS.....                                    | 29        |
| 4.3 ANÁLISE DO CRESCIMENTO DE FUNGOS DAS ESPÉCIES OBSERVADAS.....                | 31        |
| 4.4 ANÁLISE DA ESPÉCIE <i>Aspergillus</i> .....                                  | 32        |
| 4.5 IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO <i>Aspergillus ssp</i> .....                          | 34        |
| 4.6 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE AFLATOXINAS.....                                  | 34        |
| <b>CONCLUSÃO.....</b>  | <b>37</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>38</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>   | <b>46</b> |

## LISTA DE TABELAS

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| TABELA 1  | Distribuição do mercado de alimentos no Brasil por espécie animal.....  | 4  |
| TABELA 2  | Características desejadas para controle de qualidade dos grãos de milho esperadas pelas análises efetuadas em uma fábrica de ração.....   | 6  |
| TABELA 3  | Teores de umidade recomendados para colheita e armazenagem de grãos sem risco de deterioração em qualquer condição climática.....   | 7  |
| TABELA 4  | Micotoxinas e microorganismos encontrados em grãos de milho.....  | 8  |
| TABELA 5  | Teor de umidade mínimo em equilíbrio com diferentes níveis de umidade relativa para a sobrevivência das principais espécies de fungos de depósitos.....   | 9  |
| TABELA 6  | Efeito do armazenamento do milho em diferentes condições sobre o conteúdo de gordura do próprio grão e da dieta em que foi incorporado.....   | 11 |
| TABELA 7  | Níveis adequados e recomendados de produtos inibidores de fungos a base de ácido propiônico (>60% de concentração) para milho armazenado em silos.....  | 18 |
| TABELA 8  | Valores médios da porcentagem da umidade de grãos de milho submetidos às diferentes concentrações da associação de ácidos orgânicos nos períodos de armazenamentos e os períodos de armazenamento em relação às concentrações da associação de ácidos orgânicos (A.A.O. L.t <sup>-1</sup> ).....  | 26 |
| TABELA 9  | Valores médios da porcentagem da proteína bruta de grãos de milho submetidos ao tratamento com diferentes concentrações da associação de ácidos orgânicos (A.A.O. L.t <sup>-1</sup> ) em relação aos três períodos de armazenamento (2, 4 e 6 meses).....   | 27 |
| TABELA 10 | Valores médios do extrato etéreo de grãos de milho nas diferentes concentrações da associação de ácidos orgânicos em relação aos períodos de armazenamento e os períodos de armazenamento diante de cada concentração da associação de ácidos orgânicos (A.A.O.L.t <sup>-1</sup> ).....   | 28 |
| TABELA 11 | Valores médios da porcentagem de todas as espécies de fungos encontradas no milho, <i>Aspergillus ssp.</i> , <i>Penicilium ssp.</i> , <i>Fusarium ssp.</i> , em três períodos de armazenamento submetidos ao tratamento com diferentes concentrações da associação de ácidos orgânicos e as concentrações da associação de ácidos orgânicos (A.A.O. L.t <sup>-1</sup> ) diante dos períodos de armazenamento..... | 32 |
| TABELA 12 | Valores médios da porcentagem de grãos de milho infectados pelo fungo do gênero <i>Aspergillus</i> submetidos ao tratamento às diferentes concentrações da associação de ácidos orgânicos (A.A.O. L.t <sup>-1</sup> ).....  | 33 |
| TABELA 13 | Valores médios da porcentagem dos grãos de milho infectados pelo fungo <i>Aspergillus</i> nos três períodos de armazenamento, 2, 4 e 6 meses, em relação as concentrações da associação de ácidos orgânicos utilizadas (0, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 L.t <sup>-1</sup> ).....   | 33 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| TABELA 14 | Valores médios da concentração de aflatoxinas em grãos de milho infectados nos três períodos de armazenamento.....  | 34 |
| TABELA 15 | Valores médios da concentração de aflatoxinas nos três períodos de armazenamento em grãos de milho submetidas ao tratamento com diferentes concentrações da associação de ácidos orgânicos (A.A.O.L.t <sup>-1</sup> ) | 35 |

## LISTA DE FIGURAS

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| FIGURA 01 | Câmara de acondicionamento das amostras de milho e visualização do termo higrômetro de máxima e mínima.....   | 21 |
| FIGURA 02 | Placas de Petri mostrando o desenvolvimento de fungos em grãos de milho nas concentrações 01 = testemunha ( $0,0 \text{ L.t}^{-1}$ ), 02 ( $1,0 \text{ L.t}^{-1}$ ), 03 ( $1,5 \text{ L.t}^{-1}$ ), 04 ( $2,0 \text{ L.t}^{-1}$ ) e 05 ( $2,5 \text{ L.t}^{-1}$ ) da associação de ácidos orgânicos aos 2,4 e 6 meses de armazenamento..... | 30 |
| FIGURA 03 | Visualização em microscópio óptico, aumento 40 x do fungo <i>Aspergillus ssp.</i> .....   | 34 |

## LISTA DE ANEXOS

|            |   |    |
|------------|---|----|
| ANEXO I    | Dados relativos à temperatura média, máxima e mínima, umidade relativa média, máxima e mínima durante o armazenamento do milho na câmara de amostras..... | 47 |
| ANEXO II   | Valores médios da umidade, proteína bruta e extrato etéreo em amostras de milho em três períodos de armazenamento (2, 4 e 6 meses).....                   | 48 |
| ANEXO III  | Análise de variância da porcentagem de umidade.....   | 48 |
| ANEXO IV   | Análise de variância da proteína bruta.....   | 48 |
| ANEXO V    | Análise de variância do extrato etéreo.....   | 48 |
| ANEXO VI   | Análise de variância da porcentagem de fungos.....  | 49 |
| ANEXO VII  | Análise de variância da porcentagem do aspergillus.....   | 49 |
| ANEXO VIII | Análise de variância da concentração de aflatoxinas.....  | 49 |

## RESUMO

O crescimento de fungos com a conseqüente produção de micotoxinas tem ocasionado sérios prejuízos no desenvolvimento dos animais pela contaminação da alimentação. Pesquisas com o intuito de minimizar as reações adversas têm sido realizadas. O milho, que faz parte da nutrição animal em uma porcentagem de 60%, é sensível ao desenvolvimento de fungos dependendo das condições que é cultivado e armazenado. Há um decréscimo dos valores nutritivos contidos no milho devido à contaminação por fungos. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a eficácia do tratamento com uma associação de ácidos orgânicos no controle do desenvolvimento de fungos em um período de seis meses em nível de laboratório. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os tratamentos representaram o arranjo fatorial 5 x 3, sendo 5 concentrações da associação de ácidos orgânicos (0; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 L.t<sup>-1</sup>) e 3 tempos de armazenamento do milho (2, 4 e 6 meses) e 4 repetições em um total de 60 amostras. Os resultados demonstraram que a associação de ácidos orgânicos foi eficiente em diminuir o número de colônias fúngicas encontradas infectando os grãos de milho armazenados. A concentração de 2,5 L.t<sup>-1</sup> proporcionou maior controle no desenvolvimento de fungos com 2 e 4 meses de armazenamento. Nos 3 períodos de armazenamento, 2, 4 e 6 meses, não houve alteração na concentração de aflatoxinas independente da concentração da associação de ácidos orgânicos. Aos 2 meses de armazenamento, na concentração de 2,5 L.t<sup>-1</sup> da associação de ácidos orgânicos, o extrato etéreo teve uma conservação melhor.

Palavras – chave: aditivos, micotoxinas, nutrição animal.

## ABSTRACT

The growth of fungus with the consequent production of micotoxins has caused serious damages in the development of the animals for the contamination of the feeding. Research with intention to minimize the adverse reactions has been carried through. The corn, that is part of the animal nutrition in a 60% percentage, is sensible to the development of fungus depending on the conditions that is cultivated and stored. It has a decrease of the nutritional values contained in the maize due the contamination for fungus. The objective of this research was to evaluate the effectiveness of the treatment with an association of organic acid in the control of the development of fungus in a period of six months in laboratory level. The experimental delineation entirely was random. The treatments had represented factorial arrangement  $5 \times 3$ , being 5 organic acid concentration of the association of (0; 1,0; 1,5; 2,0 and 2,5 L.t<sup>-1</sup>) and 3 times of storage of the corn (2, 4 and 6 months) and 4 repetitions in a total de 60 samples. The acid results had demonstrated that the association of organic acid in diminishing the number of fungus colonies found infected the stored grains of corn. The concentration of 2,5 L.t<sup>-1</sup> provided greater has controlled in the development of fungus with 2 and 4 months of storage. In the 3 periods of storage, 2, 4 and 6 months, did not have alteration in the aflatoxin the independent concentration of the acid concentration of the association of organic. To the 2 months of storage, in the concentration of 2,5 L.t<sup>-1</sup> of the association of organic acid, the etereo extract had better conservation.

Key words: additives, mycotoxins, animal nutrition.

## INTRODUÇÃO

Na exploração econômica das aves procura-se dentro dos ingredientes que compõe as rações, assegurar a inclusão de determinadas matérias primas, em específico o milho em grãos, que proporcionou resultados satisfatórios na alimentação destes animais e obtenção de elevados resultados zootécnicos.

O fator qualidade da matéria prima é essencial para se formular uma ração de alta qualidade, permitindo o máximo da expressão de desempenho das aves, tanto na produção de ovos como de carne.

Para a avicultura, o milho assume papel de vital importância na alimentação pelo fato de compor cerca de 60% de uma dieta inicial para frangos de corte e aproximadamente 65% da energia metabolizável da ração, e cerca de 20% de proteína em rações iniciais (DALE & JACKSON, 1994).

O milho é um dos grãos que ocupa grande espaço nos armazéns e silos no Brasil e um dos grandes problemas na armazenagem destes grãos está relacionado com a presença de micotoxinas.

Segundo Dal Borgo (1980), apesar de se falar muito de aflatoxina, toxina produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*, esta representa apenas uma dentre os diferentes tipos de toxinas produzidas por fungos presentes no meio ambiente, que podem chegar em torno de 300 micotoxinas (SABINO, 1995).

Dal Borgo (1980) enfatiza que a importância destas toxinas para a indústria animal se baseia principalmente nos efeitos que provocam nos animais bem como nos resíduos tóxicos serem consumidos pelo homem nos produtos originados dos animais contaminados.

Segundo Keshavarz (1987), se a contaminação por micotoxinas já estiver presente, o uso de produtos inibidores para o controle do desenvolvimento de fungos produtores das micotoxinas, não terão a devida atuação na destruição das toxinas produzidas.

Fonseca (1980) cita que as principais micotoxinas que contaminam os grãos de milho são a aflatoxina, zearalenona (F-2), ocratoxina e dois tricotecenos, a

toxina T-2 e o deoxinivalenol, sendo os três primeiros mais freqüentemente encontrados.

As aflatoxinas são rotineiramente encontradas nos grãos de milho e também são as que têm causado mais prejuízos comprovados na produção animal.

A importância na compra, recebimento, secagem, armazenamento e industrialização do milho são importantes, uma vez que a qualidade desta matéria prima irá influenciar a formulação da ração animal.

Um dos fatores de qualidade é o teor de umidade do milho, uma vez que esta condição não se apresenta de maneira constante, desde sua colheita até o seu processamento (LAZZARI, 1997).

O milho deve possuir 12% a 15% de teor de umidade, para ser eficaz a sua administração para os animais, com relação à segurança principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento e contaminação dos grãos pelas micotoxinas. Quando presentes influenciam significativamente no desempenho da ave, se sua presença é observada de maneira constante, seja em pequena ou grande quantidade.

Um fator freqüentemente encontrado em todas as fábricas de ração é a falta de uniformidade dos grãos recebidos, independente de sua origem. Por outro lado, a qualidade dos grãos é variável em relação às suas características nutritivas e à quantidade de contaminação física, química e microbiológica.

A qualidade do milho é influenciada por fatores que iniciam no campo, uma vez que quando o milho é colhido, a presença de grãos quebrados irá exacerbar ainda mais o desenvolvimento de fungos e micotoxinas. Outro ponto importante é a questão das variedades de milho encontradas (duro, semi-duro e mole) e seu relacionamento com o desenvolvimento dos fungos e micotoxinas.

Na literatura encontram-se trabalhos técnicos que demonstram estudos realizados sobre a origem, caracterização química, toxicidade e efeitos das micotoxinas sobre a saúde e desempenho dos animais (LAZZARI, 1997, LESSON *et al.*, 1995). Alguns deles focam o problema das micotoxinas sobre o ponto de vista das fábricas de ração, relatando como proceder diante do aparecimento de grãos de milho contaminados, evitando, desta forma, os malefícios que tais ingredientes podem ocasionar nos animais.

De acordo com as considerações apresentadas, procurou-se desenvolver uma pesquisa preventiva no grão de milho através de um produto que inibisse o crescimento de fungos produtores de micotoxinas.

O produto escolhido foi uma associação de ácidos orgânicos.

Partiu-se da hipótese que se a aplicação da associação de ácidos orgânicos, no armazenamento de grãos de milho, possa inibir o desenvolvimento de fungos nestes grãos, durante um determinado período, haverá menor porcentagem de grãos contaminados neste período e conseqüentemente menores concentrações de aflatoxinas.

O objetivo geral foi avaliar a associação de ácidos orgânicos no controle de fungos em grãos de milho armazenado, no período de 6 meses.

Os objetivos específicos foram:

Avaliar o desenvolvimento dos fungos em grãos de milho diante das diferentes concentrações da associação de ácidos orgânicos e períodos de armazenamento;

Avaliar a concentração de aflatoxinas nas diferentes concentrações de ácidos orgânicos e períodos de armazenamento.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Albuquerque (1994) enfatizou a grande importância do setor avícola no Brasil através de relatos do consumo de rações das diversas espécies domésticas (Tabela 1) utilizando-se milho e soja.

TABELA 1 – Distribuição do mercado de alimentos no Brasil por espécie animal

| ATIVIDADE                                 | PORCENTAGEM |
|---|-------------|
| Indústria Avícola – frangos de corte      | 49,0        |
| Indústria Suinícola                       | 24,0        |
| Indústria Avícola –Poedeiras Comerciais   | 14,0        |
| Indústria Leiteira                        | 8,0         |
| Criação de Cavalos                        | 2,0         |
| Rações de animais de Companhia (mascotes) | 2,0         |
| Outras                                    | 1,0         |

Fonte: Albuquerque (1994)

Além do consumo acentuado de milho pela indústria avícola, pode ser salientada a grande dependência deste grão ao mercado interno de seus insumos (fertilizantes, sementes, etc.), o que confere uma instabilidade de suprimento no Brasil, além da menor qualidade comprada de outros países de agricultura mais evoluída.

Schang (1992) apresentou a participação de cada setor de produção animal na América Latina e Caribe, e destacou o Brasil como um mercado crescente e importante na produção de carne e ovos, sendo o setor responsável por cerca de 25,4% da produção total de rações na região.

Com relação ao apresentado anteriormente (Tabela 1), pode-se observar que o setor avícola tem grande participação no consumo de milho, que é um ingrediente básico para compor as rações. Esta dependência cria uma necessidade de controle da qualidade deste grão para rações, ponto essencial para o sucesso da produção.

## 2.1 O MILHO E A PRODUÇÃO DE RAÇÕES

Um dos grandes pontos a serem considerados por um bom produtor avícola é a qualidade das rações oferecidas no mercado. Saxena (1985) observa que para se obter uma boa eficiência nas operações de produção de rações, alguns pontos devem ser considerados: escolha correta dos ingredientes, formulações de baixo custo, granulometria dos ingredientes e da ração final, processo de mistura, controle de qualidade e desempenho do plantel.

Os ingredientes para rações como produtos agrícolas podem sofrer grandes alterações em sua uniformidade e também em sua qualidade desde a colheita até o processamento (LAZZARI, 1992).

Lazzari (1997) citou que alguns fatores como o teor de umidade, presença de grãos danificados por fungos (grãos embolorados, mofados, gérmen danificado, sem cor, aquecidos, fermentados ou ardidos), grãos quebrados, matérias estranhas, impurezas, presença de micotoxinas, teores de óleo e níveis de proteína, podem informar com certa precisão a qualidade de um lote de grãos.

De acordo com Pinto e Pastore (1995), o milho se caracteriza como uma excelente fonte energética e de pigmentos para aves, mas uma série de problemas deve ser levada em conta em uma fábrica de rações, dentre os quais: excesso de umidade, presença de altos teores de grãos quebrados, ardidos e podres, presença de sementes de plantas invasoras da cultura, presença de material estranho e mofado, presença de micotoxinas.

Os autores reiteram ainda que nas análises para recebimento do milho na fábrica, 90% dos problemas podem ser detectados e sugerem um padrão de qualidade para os grãos a serem aceitos (Tabela 02).

TABELA 2 - Características desejadas para controle de qualidade dos grãos de milho, esperadas pelas análises efetuadas em uma fábrica de rações.

| Análise de recebimento                 | Padrões     |
|--|-------------|
| Ardidos, mofados e (%)                 | 3, 6 e 10%  |
| Carunchados, chochos e queimados (%)   | 3, 6 e 10%  |
| Impurezas e quebrados (%)              | 1,5, 2 e 3% |
| Sementes de invasoras e/ou tóxicas (%) | zero        |
| Grãos tratados com pesticidas          | zero        |
| <u>Análise química recomendada</u>     |             |
| Umidade (%)                            | < 14        |
| Xantofila (ppm)                        | 20 a 30     |
| Aflatoxina (ppb)                       | < 20 ppb    |
| Proteína bruta (%)                     | 7 - 10%     |

Fonte: Pinto e Pastore (1995).

## 2.2 ASPECTOS SOBRE A ARMAZENAGEM DO GRÃO DE MILHO

O teor de umidade dos grãos é o principal fator que governa as qualidades do produto armazenado, sendo extremamente importante se conhecer o teor de umidade na colheita visando não permitir a ocorrência de consideráveis perdas (PUZZI, 1986).

Gerage *et al.* (1982), informam que normalmente quando da maturação dos grãos de milho, sua umidade gira em torno de 25% para a colheita mecânica, necessitando posteriormente de secagem para reduzir a umidade dos grãos ao nível ideal de armazenagem que é de 12 a 13%. Os autores salientam que em sistemas de secagem a campo, ou seja, na própria planta, para posteriormente se proceder a colheita e debulha manual, há grande possibilidade de alteração na qualidade do produto pela ação de fatores climáticos, pragas e doenças que comprometem o produto grão a armazenar.

Existem variações quanto ao tempo e variações de perdas de umidade dos grãos e sementes de acordo com as condições climáticas antes e depois da colheita e também por características particulares de diversas variedades genéticas (LAZZARI, 1997).

Os principais fatores físicos que afetam a colheita e o armazenamento dos grãos são a temperatura, a umidade e danos mecânicos aos grãos (PUZZI, 1986).

Na Tabela 3 são apresentados os dados compilados por Lazzari (1997) em relação aos teores de umidade para colheita e armazenagem seguras de diversos tipos de grãos.

TABELA 3 – Teores de umidade recomendados para colheita e armazenagem de grãos sem risco de deterioração em qualquer condição climática.

| Produto  | Tempo de armazenagem |           |                |
|----------|----------------------|-----------|----------------|
|          | Colheita             | Até 1 ano | Mais que 1 ano |
| Aveia    | 15-20                | 12-13     | 11             |
| Cevada   | 18-20                | 13        | 12             |
| Girassol | 15-18                | 8-9       | 7,5            |
| Milho    | 24-32                | 13-14     | 12             |
| Soja     | 15-18                | 12-13     | 11             |
| Sorgo    | 28-32                | 12-13     | 11             |
| Trigo    | 18-20                | 13-14     | 12             |

Fonte: Lazzari (1997)

Os danos mecânicos nos grãos ocorrem no transporte, limpeza, secagem e colheita e dão origem à produção de grãos quebrados, partidos e trincados que aumentam quanto menores forem os teores de umidade dos grãos (PUZZI, 1986).

### 2.3 ALTERAÇÕES NO VALOR NUTRICIONAL DO MILHO

O alto conteúdo em carboidratos, principalmente o amido, e de outros componentes como proteínas e ácidos graxos, fazem do milho um importante produto comercial e em condições inadequadas de armazenamento, esse grão pode sofrer perdas no valor quantitativo e qualitativo devido principalmente ao ataque de pragas desde o campo até a época de consumo (LOPES *et al.* 1988).

Rostagno (1993) ressaltou que o grão de má qualidade tem o valor nutritivo prejudicado em relação ao grão normal de várias maneiras: por alteração da composição química, por diminuição da biodisponibilidade de alguns nutrientes, pela presença de fatores antinutricionais, pela proliferação de fungos com ou sem a produção de micotoxinas.

### 2.4 AÇÃO DAS MICOTOXINAS

Micotoxinas são substâncias tóxicas formadas durante o crescimento dos fungos.

Os fungos são seres vivos e, portanto, precisam se alimentar. Em condições de armazenamento, os nutrientes necessários para seu desenvolvimento são extraídos dos grãos ou rações. O principal alvo dos fungos é a gordura ou extrato etéreo dos alimentos, uma vez que esta porção apresenta

níveis elevados de energia. Alimentos contaminados por fungos apresentam um substancial empobrecimento energético (KRABBE *et al.*, 1995).

Existem aproximadamente 300.000 diferentes espécies de fungos que podem estar presentes em toda parte, crescendo em vários tipos de substratos.

Um dos grandes problemas na armazenagem dos grãos e conseqüentemente do preparo das rações está relacionado com a presença de micotoxinas. Um aspecto importante relacionado com a presença de fungos em grãos é a perda nutricional ocasionada pelo desenvolvimento fúngico, de maneira que em condições reais, as micotoxinas estão associadas com grãos de menor qualidade bromatológica.

Os fungos são a principal causa de deterioração e as perdas são imperceptíveis a olho nu, ou com o uso de lupas e os prejuízos de sua ação só são visíveis em nível de conseqüência econômica (PUZZI, 1986).

Lazzari (1997) apresentou os principais grupos capazes de invadir e danificar sementes, grãos, fibras naturais e seus subprodutos, sendo divididos como fungos de campo, fungos intermediários e fungos de armazenamento. Nazareno (1982) apresentou as principais micotoxinas identificadas como contaminantes do milho (Tabela 4).

TABELA 4 – Micotoxinas e microorganismos encontrados nos grãos de milho.

| <b>TOXINA</b>   | <b>MICROORGANISMOS</b>   |
|---|--|
| Aflatoxina B1, B2, G1, G2                                 | <i>Aspergillus flavus</i> e <i>A. parasiticus</i>                                    |
| Ochratoxinas (Nefrotoxinas)                               | <i>A. ochraceus</i> e <i>Penicillium viridicattum</i>                                |
| Sterigmatocistina   | <i>A. nidulans</i> e <i>A. versicolor</i>  |
| Toxina termogênica  | <i>A. flavus</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. palitans</i>                          |
| Patulina  | <i>P. urticae</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. claviforme</i> , <i>A. clavatus</i> . |
| Rubratoxina   | <i>P. rubrum</i>   |
| Citrinina   | <i>P. citrinum</i>   |
| Vomitoxina (deoxynivalenol)                               | <i>Fusarium roseum</i> f. sp. <i>cerealis</i> ( <i>Giberella zeae</i> )              |
| Tricotecenos(T-20)diatoxyscirpenol monoacetoxyscirpenol,) | <i>F. tricinatum</i> , <i>F. roseum</i> , <i>F. equiseti</i> e <i>F. lateritium</i>  |
| Zearalenona e zearalenol                                  | <i>F. roseum</i> , <i>F. tricinatum</i> , <i>F. moniliforme</i>                      |

Fonte: Adaptado de Nazareno (1982)

Segundo Dal Borgo (1980), apesar de se falar muito da aflatoxina, toxina produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*, esta representa apenas uma dos 100 diferentes tipos toxinas produzidas por fungos presentes no meio ambiente. O autor ressaltou que a importância destas toxinas para a indústria animal, se baseia principalmente verificando seus efeitos nos animais e na possibilidade dos

resíduos tóxicos serem absorvidos na carne dos animais e consumidos pelo homem.

De acordo com Puzzi (1986), os fungos de campo, cujas espécies principais são do gênero *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Helminthosporium*, podem alterar a aparência dos grãos e conseqüentemente o valor comercial do produto. O autor apresentou como fungos de armazenamento ou de depósito, aqueles do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, que são os mais freqüentes, e seu desenvolvimento se dá nos níveis de umidade dos grãos e do ar apresentados (Tabela 5).

TABELA 5 – Teor de umidade mínimo em equilíbrio com diferentes níveis de umidade relativa para a sobrevivência das principais espécies de fungos de depósito.

| Grãos | Aspergillus         |                    |                   |                 | Penicillium       |
|-------|---------------------|--------------------|-------------------|-----------------|-------------------|
|       | <i>A.restrictus</i> | <i>A.ochraceus</i> | <i>A.candidus</i> | <i>A.flavus</i> | Diversas espécies |
|       | 70%UR               | 73%UR              | 80%UR             | 85%UR           | 80-90%UR          |
| Milho | 13,5-14,5           | 14-14,5            | 15-15,5           | 18-18,5         | 16,5-19           |
| Trigo | 13,5-14,5           | 14-14,5            | 15-15,5           | 18-18,5         | 16,5-19           |
| Sorgo | 14,0-14,5           | 14,5-15            | 16-16,5           | 19-19,5         | 17-19,5           |
| Soja  | 12,0-12,5           | 12,5-13            | 14,5-15           | 17-17,5         | 16-18,5           |

Fonte: Puzzi (1986)

Sabe-se que as aflatoxinas têm sido freqüentemente identificadas em alimentos e rações para animais produzidos no Brasil. Isto se deve a contaminação que ocorre nos armazéns e em alguns casos a contaminação já vem do campo. As aflatoxinas mais observadas no milho são a B1, B2, G1 e G2 (LAZZARI,1997). O autor observou que essas substâncias provocam sérios prejuízos aos animais domésticos.

Apesar dos problemas conhecidos com aflatoxinas, a sua incidência em níveis mais altos é bastante variável, o que demonstrou Sabino (1995) analisando a coleta de 165 amostras da região sul e 163 amostras da região sudeste, observou apenas 30 e 14 amostras positivas, respectivamente, para aflatoxina B1 e destas somente uma estava contaminada com níveis superiores a 500 ppb.

Isto pode representar perdas consideráveis para produtores de grande e médio porte, como demonstraram Jones *et al.* (1982), onde ressaltando que quando os níveis de aflatoxina encontrados no milho, aumentaram de 1,2 para 8,8 ppb, verificaram em uma integração de aves que a porcentagem de condenação

em nível de abate aumentou de 1,39 para 1,73, e o índice de mortalidade teve acréscimo de 4,02 para 7,22%.

Hamilton (1977) relatou que os efeitos da aflatoxina são bastante variáveis, estando relacionados principalmente aos dados de desempenho produtivo e reprodutivo.

Wyatt (1985) observou que a aflatoxina estava relacionada com a Síndrome de Má Absorção em aves, devido sua característica similar com esta infecção viral.

As micotoxinas, das quais a aflatoxina é a principal, podem determinar queda na produção de ovos, no peso dos ovos e provocar produção de uma casca mais fina (ITO, 1994).

Fiorentin *et al.* (1987), analisando a contaminação de milho em granjas, fábricas de ração e armazéns de cooperativas de Santa Catarina, observaram que os maiores índices de contaminação com aflatoxinas ocorreram no período de seis meses de armazenamento, coincidindo com a época de maiores temperaturas e umidade na região.

Beasley *et al.* (1980) observaram queda de desempenho em frangos de corte durante o período de produção alimentado com milho contaminado por *Penicillium lanosum*, onde as aves apresentaram sintomas como diarreia, nefrite tóxica e erosão de moela.

Nas pesquisas realizadas em granjas de frangos de corte nos Estados Unidos, Jones *et al.* (1982) verificaram que dependendo da fonte de coleta de milho para análise, havia variação nos níveis de contaminação com aflatoxinas de acordo com o local de coleta, conforme o tempo entre a fabricação e a alimentação das aves.

Stringhini *et al.* (1993) utilizaram rações formuladas com milho contaminado com micotoxinas para frangos de corte, e não observaram alterações nos pesos relativos de fígado, pâncreas e Bursa de Fabricius com 20 a 40% de contaminação de grãos de milho, porém foram observadas lesões em nível de intestino delgado e fígado.

Bartov *et al.* (1982), estudando o efeito da contaminação fúngica sobre o valor nutricional e desempenho de frangos de corte, observaram que havia

redução nos níveis de gordura do milho armazenado em dois teores de umidade diferentes (13 e 15,1%) e sob duas condições, grão inteiro e triturado (Tabela 6).

TABELA 6 – Efeito do armazenamento do milho em diferentes condições sobre o conteúdo de gordura do próprio grão e da dieta em que foi incorporado.

| Armazenamento   | CONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM |                | Conteúdo de Gordura no grão (%) | Rações                  |       |
|-----------------|--------------------------|----------------|---------------------------------|-------------------------|-------|
|                 | Nível de Umidade (%)     | Duração (dias) |                                 | Conteúdo de gordura (%) |       |
|                 |                          |                |                                 | INICIAL                 | FINAL |
| Milho inteiro   | 13,0                     | 96             | 3,9                             | 3,5                     | 3,6   |
| Milho inteiro   | 15,1                     | 96             | 3,9                             | 3,8                     | 3,6   |
| Milho triturado | 13,0                     | 96             | 3,8                             | 3,7                     | 3,6   |
| Milho triturado | 15,1                     | 96             | 2,4                             | 2,9                     | 2,7   |
| Milho triturado | 12,7                     | 63             | 3,4                             | 3,7                     | 3,4   |
| Milho triturado | 15,0                     | 63             | 1,5                             | 2,4                     | 1,9   |

Fonte: Adaptado de Bartov et al. (1982).

Smith *et al.* (1992), estudando os efeitos individuais da aflatoxina e da sua associação com o ácido ciclopiazônico, micotoxina produzida por *Aspergillus flavus* e *Penicillium cyclopium*, observaram efeitos de decréscimo no ganho de peso, com aumento relativo do peso dos rins e concentração no soro aumentada para nitrogênio ureático e reduzida para proteína, albumina, colesterol, fósforo e atividade de lactato desidrogenase.

A ação do uso conjugado de aflatoxina e ácido ciclopiazônico mostrou aumento de peso relativo de fígado, rins, pâncreas e proventrículo, reduzido para Bursa de Fabricius, enquanto as concentrações séricas foram reproduzidas para albumina e fósforo e aumentada para transaminase glutamato-oxalacetato e nitrogênio ureático.

Rostagno (1993) observou que rações produzidas com grãos contendo micotoxinas, provocaram redução nos valores de energia metabolizável da matéria seca e dos aminoácidos, como também prejuízos na produção de enzimas pancreáticas (tripsina, amilase e lipase) com redução nas taxas de utilização de nutrientes lipossolúveis, em virtude de afetar principalmente fígado e rins.

Os principais métodos de controle para evitar a ação de fungos nos grãos armazenados consistem em manter o teor de umidade, temperatura e taxas de oxigênio a níveis desfavoráveis para seu desenvolvimento. O autor sugere a secagem rápida e eficiente (logo após a colheita), para atingir os níveis de

umidade desejados, o controle de impurezas nos grãos e aeração da massa armazenada para manter a uniformidade de temperatura e umidade. O uso de ácido orgânico e adsorvente de micotoxinas se constitui em alternativas para o controle do desenvolvimento dos fungos ou de redução dos efeitos negativos das micotoxinas (PUZZI, 1986).

Alguns autores estudaram correções nutricionais a realizar quando a ração ou o milho estivesse contaminado por micotoxinas. Bartov *et al.* (1982) verificaram que suplementação com gordura para rações formuladas a base de milho com crescimento fúngico pode corrigir o desempenho, desde que o nível de micotoxinas dos grãos esteja abaixo dos níveis tóxicos.

Rogers *et al.* (1991) estudaram as relações entre níveis de triptofano e de aflatoxina e seus efeitos sobre o acúmulo de gordura e sua associação com efeitos da aflatoxicose em poedeiras brancas. Os autores basearam-se no fato que o triptofano pode contribuir para reduzir os níveis de gordura hepática nas aves, e no experimento acima se observou essa redução, porém a associação triptofano-aflatoxina, resultou em menor taxa de produção de ovos e um aumento das lesões ocasionadas por aflatoxina.

As toxinas produzidas por *Fusarium moniliforme* podem ter efeitos deletérios. Rotter *et al.* (1992) observaram efeitos de redução no ganho de peso, consumo de ração e piora a eficiência alimentar, principalmente com a presença de deoxinivalenol nas rações de suínos em crescimento.

Marijanovic *et al.* (1991) observaram em machos Leghorn, pesos relativos da Bursa de Fabricius, baço, timo, bem como efeitos imunodepressores, e concluíram que o uso de alimento contaminado por *Fusarium moniliforme* pode produzir deficiências no sistema imune das aves.

Outras micotoxinas são produzidas por *Fusarium moniliforme*, e todas com efeitos negativos sobre o desempenho. Friend *et al.* (1992) observaram reduzido ganho de peso para leitões até cinco semanas, bem como menor consumo de ração e aumento das lesões na região esofagiana em estudos com deoxinivalenol associado a toxina T-2. Giroir *et al.* (1991) observaram que não existem diferenças em termos da eliminação metabólica da toxina T-2 em galinhas e marrecos de Pequim, e que a toxina não foi detectável no sangue, cérebro ou gordura, mas acumulou-se nos ossos, músculos e moela.

Outro grupo de micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium*, os scerpentrióis, podem causar lesões bucais em frangos (ADEMOYERO, 1991) e empenamento anormal (PARKHURST *et al.*, 1992).

As ocratoxinas, produzidas por *Aspergillus* e *Penicillium* são descritas como causadoras de problemas com pior desempenho produtivo e supressão da resposta imune em suínos (LIPPOLD *et al.*, 1992 e HARVEY *et al.*, 1992), sendo também descritos casos de mau desempenho em frangos de corte (RUIZ e CAMARGO, 1992).

Outro metabólito produzido por *Fusarium*, a zearalenona, causa o hiperestrogenismo, e os suínos são os animais mais sensíveis (LAZZARI, 1997). Alguns relatos para aves sugerem problemas relacionados com a queda de postura observada em poedeiras que receberam milho contaminado.

## 2.5 AÇÃO DAS AFLATOXINAS

Os estudos sobre as aflatoxinas iniciaram quando houve na Inglaterra uma mortalidade de aproximadamente 100.000 perus devido à ingestão de farelo de amendoim contaminado com aflatoxinas (LANCASTER *et al.*, 1961) A partir desta data, muitas outras micotoxinas foram descobertas ocasionando prejuízo nos animais e sempre relacionado com grãos e cereais contaminados.

As aflatoxinas não são produzidas somente pelos fungos da espécie *Aspergillus flavus*, produtor das aflatoxinas B1 e G1 e *Aspergillus parasiticus*, produtor das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. Outras espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus spp.* pode produzir a micotoxina aflatoxina.

No Brasil, um estudo realizado por Castro *et al.* (1995) demonstrou que os fungos mais comumente encontrados em grãos e cereais são *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.* e *Aspergillus spp.*, entre outros, a partir deste estudo, dezenas de micotoxinas já foram detectadas em cereais destinados ao consumo animal.

A produção de aflatoxinas pelos fungos está relacionada a fatores ambientais, biológicos e químicos, possibilitando que mais de uma toxina possa ser encontrada num mesmo substrato. Entretanto, é importante considerar que a presença de fungos em cereais não assegura a presença de aflatoxina, bem como sua ausência não garante a não existência da aflatoxina, uma vez que esta pode persistir após a eliminação do agente. Cada espécie fúngica pode produzir

mais de uma toxina, da mesma forma que uma micotoxina pode ser produzida por mais de um tipo de fungo.

De acordo com Ramos e Hernandez (1996), a absorção de aflatoxinas ocorre por difusão passiva através do intestino, difundindo-se rapidamente por todo o organismo de maneira que três horas após alimentação, aflatoxinas B1 e B2 podem ser encontradas em todos os tecidos, principalmente fígado e moela das aves.

A exposição às aflatoxinas pode ser aguda ou crônica dependendo da dose da micotoxina ingerida, tempo de exposição, e do estado de saúde do animal.

A biossíntese de aflatoxinas ocorre em ambientes com temperaturas entre 8 °C e 42 °C, sendo que a temperatura ideal ocorre em torno de 27 °C, em substratos com elevada umidade, em plantas sob estresse por temperaturas altas, grãos com danos mecânicos provocados pela manifestação de insetos, ou como resultado na falta de orientação na colheita, o que facilita a entrada de microorganismos (GOURAMA e BULLERMAN, 1995; BOSQUE 1996).

No Brasil, a legislação permite o limite máximo de 50 ppb para aflatoxinas B1 e G1 ou a soma das duas, para utilização de produtos e subprodutos agrícolas (SCUSSEL, 1998).

## 2.6 CONTROLE DAS MICOTOXINAS

A melhor maneira de impedir o desenvolvimento de micotoxinas e seus efeitos nocivos é realizada quando é controlado o crescimento de fungos. Todas as medidas empregadas para diminuir a manifestação fúngica como alta umidade (65 a 70%) durante a armazenagem, presença de insetos nas culturas de grãos, má conservação de grãos, temperatura entre outras, evitam problemas com micotoxinas e perdas nutricionais nos grãos.

Neste aspecto, existem controles que podem ser realizados evitando o crescimento de fungos com a presença ou não de micotoxinas, e metodologias que atuam via aparelho digestório do animal quando as micotoxinas estão presentes.

No primeiro controle mencionado, aparecem os ácidos orgânicos com poder eficiente no controle do desenvolvimento dos fungos nos grãos

armazenados, pois agem diminuindo o pH do meio, tornando-o impróprio para o crescimento dos fungos (KRABBE *et al.*, 1994a).

Os ácidos orgânicos inibem o crescimento dos microorganismos através de sua entrada nas células e dissociação no interior destas. Tal processo é responsável pela acidificação do citoplasma das células, resultando na inibição do transporte de nutrientes. O consumo de energia dos fungos aumenta na tentativa de manter o pH homeostático. Devido ao processo de sobrevivência, ocorre um estreitamento da faixa de pH, promovendo a morte ou a inibição da célula. Isto ocorrendo, o fungo perde a capacidade de desenvolvimento.

Entre os ácidos orgânicos, há o ácido propiônico que inibe o crescimento fúngico, mas por outro lado ocasiona efeitos não satisfatórios como corrosão de equipamentos e produção de vapores cáusticos e adstringentes.

Devido às circunstâncias negativas oriundas deste ácido orgânico, foi necessário à utilização, para uma melhor efetividade, de uma mistura de ácidos orgânicos, que além de incluir o propiônico, possui mais o ácido acético, o benzóico e o sórbico, resultando na formação de um complexo com capacidade tamponante muito maior que a do sistema convencional sal/ácido de tamponamento.

O complexo tamponado dissocia-se na presença de umidade, liberando ácido propiônico, o qual promove a inibição fúngica (KRABBE *et al.*, 1995).

Verifica-se uma atividade satisfatória da mistura dos ácidos descritos acima no controle primário para impedir o desenvolvimento de fungos como também preserva os teores de gordura e qualidade dos grãos (KRABBE *et al.*, 1995).

Lazzari (1997) apresentou alguns métodos químicos como o uso de ozônio, peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio, formaldeído, hidróxido de cálcio e amônia líquida ou em gás, que atacam a aflatoxina. Foram citados também agentes sequestrantes como os aluminossilicatos de sódio e cálcio hidratados que tem forte atração eletroquímica pelas aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, podendo ser utilizados nas dosagens de 0,1 a 0,5% por tonelada métrica de produto.

Quando as micotoxinas já estão presentes, qualquer medida aplicada com o intuito de reduzir os efeitos nocivos destas substâncias torna-se difícil e onerosa.

No geral, o controle de micotoxinas pode estar dividido em métodos químicos, biológicos e físicos.

Como métodos químicos consistem em degradar ou inativar as micotoxinas, com o uso de ácidos, bases, aldeídos, agentes oxidantes e vários gases dentre os quais se podem destacar a amonização como uma forma de detoxificação para fumonisinas (NORRED, 1993). Estes métodos por sua vez têm sido considerados não práticos, ineficazes ou inseguros para grandes quantidades de grãos, além de diminuir os níveis nutricionais e o paladar do alimento (PARK *et al.*, 1988).

A caracterização dos métodos biológicos inclui a utilização de microorganismos, como leveduras, bolores e bactérias, para modificar e ou inativar as micotoxinas. Stanley *et al.* (1993) descreve o *Saccharomyces cerevisiae* atenuando os efeitos de aflatoxinas.

Para os controles físicos das micotoxinas cita-se a inativação térmica, irradiação gama, segregação por densidade, extração por solventes e adsorção por várias substâncias.

O uso de adsorventes nas rações tem sido utilizado devido a praticidade de sua colocação e não requerer nenhum equipamento especial. Vários minerais contendo sílica, os chamados aluminossilicatos, são indicados como adsorventes de micotoxinas (SCHEIDELER, 1993; BAILEY *et al.*, 1999; TAYLOR, 1999).

O mecanismo de ação dos adsorventes está baseado na troca de cargas entre eles e as micotoxinas. Entretanto, as estruturas das micotoxinas são diferentes e a atividade dos adsorventes não é igual para todas as micotoxinas dos fungos. Kubena *et al.* (1991) demonstraram que estes minerais possuem uma boa atividade tanto em *in vitro* como *in vivo* em reduzir os efeitos das aflatoxinas. Brown *et al.* (1992); Huff *et al.* (1992); Ramos e Hernandez (1996); Kubena *et al.* (1998); Santin (2000) verificaram que os adsorventes parecem não ter uma boa efetividade contra outras micotoxinas como fumonisinas, DON, T-2 e ocratoxinas. Existe também uma variação entre os aluminossilicatos, alterando a capacidade de adsorção.

Outra observação com relação a estes minerais é que eles possuem a capacidade de adsorver minerais, vitaminas, promotores de crescimento e

coccidiostáticos que fazem parte da formulação de rações, fazendo com que os animais fiquem mais susceptíveis a doenças infecciosas (SHRYOCK *et al.* 1994).

As micotoxinas apresentam relevância como uma das fontes fornecedoras de prejuízos com relação ao desempenho dos animais.

Wyatt (1994) apresentou alguns pontos para diminuir a contaminação por micotoxinas: examinar as matérias primas especialmente os grãos de cereais e leguminosas; ventilar os grãos armazenados; examinar a umidade do local do armazenamento; verificar a presença de micotoxinas na propriedade produtora; limpar periodicamente os equipamentos e silos da fábrica de ração; limpar os silos das propriedades produtoras; reduzir o tempo de armazenamento das matérias primas e rações; adicionar aditivos na dieta em caso de suspeita; não usar produtos contaminados para os animais e controlar os insetos.

Existem métodos para avaliar a concentração de micotoxinas que são chamados métodos cromatográficos. Entre eles se destaca a Cromatografia em Camada Delgada (TLC), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e a Cromatografia Gasosa (GC). A cromatografia líquida de fase reversa, como técnica de separação, determinação e análise de micotoxinas em alimentos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (FRISVAD e THRANE, 1993; SCOTT, 1995).

O Teste de ELISA é outra metodologia para determinação e análise das micotoxinas.

## 2.7 UTILIZAÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS NO CONTROLE DE FUNGOS

O uso dos ácidos orgânicos parece inibir o desenvolvimento de fungos e potencializar a disponibilidade de nutrientes de matérias primas e rações (PENZ JR. *et al.*, 1993). De acordo com Santurio (1995), a maioria dos microorganismos cresce dentro de um enorme gradiente de pH, pois eles têm a capacidade de estabilizar o pH interno. O autor reitera que ácidos fracos com baixo potencial de ionização são potentes inibidores do transporte de aminoácidos por parte da célula fúngica, pela ionização interna do citoplasma e acidificação do conteúdo celular, impedindo a sobrevivência do microorganismo.

Krabbe *et al.* (1994a) em experimentos com milho armazenado em nível de 14 e 18% de umidade utilizando 0,5% de ácido propiônico aplicado no milho

úmido, observaram efeito positivo no controle do desenvolvimento de fungos após 62 dias de armazenagem, e as testemunhas contaminadas, tiveram redução em seus níveis de gordura bruta. Krabbe *et al.* (1994b) ofereceram rações formuladas com milho armazenado com 14 a 18% de umidade e estes últimos tiveram aplicação de 0,5% de ácido propiônico no primeiro e 62º dia de armazenamento, e não verificaram alterações de desempenho de frangos até 19 dias de idade, criados em bateria, apesar da presença das aflatoxinas.

Na Tabela 7, apresenta-se a quantidade de ácidos orgânicos que deve ser incluída para o milho armazenado em silos relacionado aos teores de umidade (SANTURIO, 1995).

TABELA 7 - Níveis adequados e recomendados de produtos inibidores de fungos a base de ácido propiônico (>60% de concentração) para milho armazenado em silos.

| Umidade média dos grãos armazenados | Quantidade de ácidos orgânicos (%) | Quantidade de ácidos orgânicos (l/ton grãos) |
|-------------------------------------|------------------------------------|--|
| 11-12                               | 0,10                               | 1,0  |
| 13-14                               | 0,20                               | 2,0  |
| 15                                  | 0,25                               | 2,5  |
| 16                                  | 0,30                               | 3,0  |
| 17                                  | 0,40                               | 4,0  |
| 18                                  | 0,50                               | 5,0  |

Fonte: Santurio (1995)

Pela exposição apresentada na revisão de literatura, fazem-se necessários mais estudos com relação ao controle de fungos no grão de milho, com produtos realmente seguros, eficazes e econômicos que não causem resíduos indesejáveis para consumo e que justifique sua aplicação no milho dando a esta cultivar prevenção efetiva contra os fungos procurando diminuir a produção da substância tóxica produzida por estes microorganismos.

Trabalhos com produtos, os chamados adsorventes, que atuam no interior do aparelho digestório das aves, tem se colocado de maneira constante no mercado com o objetivo de eliminar para fora do organismo das aves as micotoxinas produzidas pelos fungos, quando estas estão presentes.

O mais importante, porém, para controle de fungos em grãos de milho, é que os trabalhos se direcionem efetivamente de forma preventiva nesta espécie impedindo que haja o crescimento de colônias fúngicas e como resultado positivo a diminuição das micotoxinas formadas durante o seu desenvolvimento.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 LOCAL DA PESQUISA**

A pesquisa foi desenvolvida nas dependências do Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, no período de 19.04.2006 a 20.10.2006.

#### **3.2 MATERIAL UTILIZADO NA PESQUISA**

Para condução do experimento, utilizou-se uma amostra de milho oriundo da cidade de Arapoti – PR, coletada em uma fábrica de ração dos Produtos Cancela, localizada em Araucária – PR.

#### **3.3 ANÁLISE INICIAL DA .AMOSTRA**

Foi realizado exame bromatológico na amostra de grãos de milho para verificar a umidade, proteína e extrato etéreo antes do armazenamento.

Para certificar que a amostra de grãos de milho antes do armazenamento estava infectada por fungos e micotoxinas, foi realizada análise laboratorial para verificação.

##### **3.3.1 Análise bromatológica**

Os resultados apresentaram para a umidade, proteína bruta e extrato etéreo valores de 12,1%, 7,87% e 4,91 % respectivamente, antes do armazenamento.

##### **3.3.2 Análise para detecção de fungos e concentração de micotoxinas**

A amostra de grãos de milho antes de iniciar o experimento, foi submetida a exame de UFC (Unidade Formadora de Colônias) com a finalidade de observar se a amostra estava infectada por colônias de fungos.

Para a realização desta etapa da pesquisa, os grãos de milho foram colocados em placas de Petri com meio Sabouraud e depositados em estufa na temperatura de 28 °C durante o tempo de quatro dias.

A amostra de milho inicial (período zero), revelou que os grãos estavam contaminados por *Aspergillus ssp.*, *Fusarium ssp.* e *Penicillium ssp.*, de acordo com o crescimento das colônias de fungos visualizadas nas placas de ensaio enriquecidas em meio Sabouraud.

No segmento procurou-se também saber se a amostra de grãos de milho possuía a presença de micotoxinas, principalmente as aflatoxinas que são produzidas pela espécie *Aspergillus*.

Para isto, foi necessário triturar 5 gramas da amostra de grãos de milho em um moinho de faca, peneira 1 mm, marca Willey Mill, para se obter o extrato do grão de milho para detectar as aflatoxinas e a amostra foi pesada em uma balança digital, com capacidade máxima de 2 kg e precisão de 0,5 g.

Com relação à presença de micotoxinas (aflatoxinas) foi utilizado o teste de ELISA qualitativo através do aparelho marca Lionheart Diagnostics, modelo EL x 800, Universal Microplate Reader que revelou a presença de aflatoxinas não superior a 20 ppb, nível máximo permitido.

### 3.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE GRÃOS DE MILHO.

A pesquisa iniciou no dia 19 do mês de abril e as observações como exame bromatológico, detecção do número de colônias fúngicas e avaliação da presença de micotoxinas por amostra de milho foram realizadas a cada 2 meses de armazenamento, e o primeiro período de armazenamento observado foi em 18 de junho de 2006. O segundo e terceiro períodos de armazenamento foram observados respectivamente em 17 de agosto e 20 de outubro.

Utilizou-se uma câmara para acondicionamento das amostras de milho, dividida em quatro repartições, colocada em temperatura ambiente, onde foram colocados 20 frascos com 1,5 kg de milho por frasco, cinco frascos por repartição, os quais foram protegidos com tule preso com elástico na boca do frasco para impedir a entrada de insetos (Figura 01).



FIGURA 01 – Câmara de acondicionamento das amostras de milho e visualização do termo higrômetro de máxima e mínima.

No período de coletas das amostras de milho, foi utilizada uma balança para pesagem marca Filizola com capacidade máxima de 2 kg e sacos plásticos com etiquetas para coletas e identificação das amostras respectivamente.

A temperatura e umidade relativa do ar foram registradas através de um termo higrômetro digital de máxima e mínima colocado dentro da câmara de acondicionamento das amostras.

Todas as amostras de milho foram submetidas ao exame bromatológico para verificar porcentagens de umidade, proteína e extrato etéreo, como também análises micológicas e verificação de micotoxinas em relação ao início do experimento.

O objetivo principal da pesquisa foi testar um produto para controlar o desenvolvimento de fungos e foi eleito uma associação de ácidos orgânicos, administrado nas amostras de milho através de uma seringa descartável de 3 ml em camadas, onde em cada camada de milho, o frasco era fortemente agitado, após a aplicação do produto, para se conseguir uma boa homogeneização das amostras.

Foram realizados cinco tratamentos da associação de ácidos orgânicos nas amostras de grãos de milho para verificar sua real efetividade no controle fúngico.

### 3.5 DETECÇÃO DE FUNGOS NOS GRÃOS DE MILHO

A metodologia empregada para esterilizar o milho e inoculação fúngica foi adaptada de uma técnica laboratorial (PITT *et al.* 1992).

A esterilização da superfície dos grãos de milho foi realizada através da imersão das amostras em solução de hipoclorito de sódio a 2% por três vezes seguidas de três enxágües em água esterilizada, empregando-se essa forma de esterilização para minimizar a interferência de contaminação do milho.

A quantificação do número de grãos de milho infectados foi realizado adaptando a metodologia preconizada por Samson *et al.* (1996) na qual foi colocada 10 grãos de milho no meio de Agar Sabouraud Dextrose 4% suplementado com tetraciclina (100 mg/litro) em placa de Petri, contendo 10 grãos de milho cada, e cada amostra teve cinco repetições.

O período de incubação foi de quatro dias a 28 °C. Após o período de incubação, as colônias fúngicas foram identificadas e o número de grãos de milho infectados foram contabilizados em nível de gênero baseando-se na morfologia das colônias e identificação microscópicas das estruturas de frutificação.

### 3.6 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE AFLATOXINAS

Para se conseguir o extrato do milho e realizar o teste de ELISA para verificação da presença de micotoxinas, especificamente as aflatoxinas, foram necessárias 5 gramas por amostra de milho triturado colocada em frasco onde foi adicionado 25 ml de metanol a 70%.

Após o frasco foi agitado vigorosamente por três minutos e em seguida o extrato obtido foi filtrado em filtro Whatmann nº1.

Para realização do teste para micotoxinas foram utilizados 50 µL do filtrado obtido.

### 3.7 TRATAMENTOS E AVALIAÇÃO.

A associação de ácidos orgânicos utilizada foi de um produto pronto da empresa Allthec para uso sem necessidade de qualquer diluição e pouco volátil (5%). O produto possuía ácido propiônico (grande atividade antifúngica), o ácido acético (mais efetivo contra leveduras e bactérias e menos para os fungos), o

ácido benzóico (mais efetivo no controle de leveduras e bactérias e menos para os fungos) e o ácido sórbico (com ação contra leveduras e fungos e pouco ativo contra bactérias).

Todos estes ácidos encontram-se tamponados na forma de sais de amônio na formulação do produto.

As amostras de milho foram tratadas segundo a recomendação do fabricante da associação de ácidos orgânicos relacionando as concentrações crescentes.

As concentrações administradas da associação de ácidos orgânicos em uma única aplicação seguiram a seguinte ordem: 0,0 Litros por tonelada de milho ( $L.t^{-1}$ ); 1,0 Litros por tonelada de milho ( $L.t^{-1}$ ); 1,5 Litros por tonelada de milho ( $L.t^{-1}$ ); 2,0 Litros por tonelada de milho ( $L.t^{-1}$ ) e 2,5 Litros por tonelada de milho ( $L.t^{-1}$ ).

Estas concentrações foram aplicadas no milho armazenado e as avaliações da eficiência da associação de ácidos orgânicos foram realizadas nos períodos de 2, 4 e 6 meses de armazenamento.

A cada 2 meses foram realizadas coletas para o exame bromatológico, micológico e análise de micotoxinas. Foram coletadas 5 amostras de milho de cada tratamento totalizando 20 amostras, sendo retirado 60 gramas por amostra de milho.

### 3.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os tratamentos representaram o arranjo fatorial 5 x 3 sendo 5 concentrações da associação de ácidos orgânicos utilizados (0,0; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 L.t<sup>-1</sup> do milho armazenado) e 3 períodos de armazenamento do milho (2, 4 e 6 meses) e 4 repetições em um total de 60 amostras.

Para a quantificação do número de grãos de milho infectados, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, no total de 20 amostras, onde cada amostra teve 5 placas de Petri como repetição.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo Teste LSD (Least Significant Difference Test), utilizando o Programa MSTAT, Michigan Statistics.

Os dados obtidos da concentração de aflatoxinas foram transformados em raiz quadrada multiplicado por 10 para a separação de médias.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 EXAME BROMATOLÓGICO ENVOLVENDO UMIDADE, PROTEÍNA BRUTA E EXTRATO ETÉREO

Foram analisadas as variações de umidade, proteína bruta e extrato etéreo para ser verificado o efeito dos tratamentos realizados de acordo com os períodos de armazenamento, 2, 4 e 6 meses (Anexo II).

#### 4.1.1 Umidade

Houve interação significativa entre os fatores testados para a variável umidade (Anexo III).

Nas diferentes concentrações da associação ácidos orgânicos observou-se que aos 2 e 4 meses as concentrações da associação de ácidos orgânicos 0,0 e 1,0 L.t<sup>-1</sup> diferenciaram do armazenamento aos 6 meses. Nas concentrações de 1,5, 2,0 e 2,5 L.t<sup>-1</sup> os valores médios da porcentagem de umidade aos 4 meses diferenciaram dos valores médios da porcentagem de umidade aos 2 e 6 meses.

Nos tempos de armazenamento em relação às diferentes concentrações da associação de ácidos orgânicos, se observou que aos 2 meses o valor médio da porcentagem de umidade na concentração de 1,5 da associação de ácidos orgânicos diferenciou das concentrações de 0,0, 1,0 e 2,5 L.t<sup>-1</sup>. Aos 4 e 6 meses não houve diferença significativa entre os valores médios da porcentagem de umidade (Tabela 8).

TABELA 8 – Valores médios da porcentagem da umidade de grãos de milho submetidos às diferentes concentrações da associação de ácidos orgânicos nos períodos de armazenamento e os períodos de armazenamento em relação às concentrações da associação de ácidos orgânicos (A.A.O. L.t<sup>-1</sup>).

| A.A.O (L.t <sup>-1</sup> ) | PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO (meses) |          |          |
|----------------------------|-----------------------------------|----------|----------|
|                            | 2                                 | 4        | 6        |
| 0,0                        | 12,4 bc B                         | 11,3 a B | 12,9 a A |
| 1,0                        | 12,1 c B                          | 11,3 a B | 12,8 a A |
| 1,5                        | 13,1 a A                          | 11,8 a B | 12,6 a A |
| 2,0                        | 12,6 ab A                         | 11,2 a B | 12,9 a A |
| 2,5                        | 12,5 bc A                         | 11,4 a B | 12,7 a A |

CV (%) = 2,88

Médias com letras minúsculas iguais, na mesma coluna, e letras maiúsculas iguais na mesma linha, não foram estatisticamente diferentes pelo Teste LSD (P<0,05)

No experimento realizado, observou-se que os teores de umidade do grão de milho não tiveram na maioria das medias observadas uma elevação acima de 13% durante os 3 períodos de armazenamento diante das diferentes concentrações da associação de ácidos orgânicos, o que faz com que o grão de milho tenha um desenvolvimento de fungos menos acentuado .

O teor de umidade dos grãos de milho é o principal fator que direciona as qualidades do produto armazenado, sendo de relevante importância se conhecer o teor de umidade na colheita visando não permitir a ocorrência de consideráveis perdas (PUZZI, 1986). A umidade quando os grãos de milho chegam ao estado de maturação, gira em torno de 18 a 25% para colheita mecânica, e após secagem a umidade dos grãos em nível ideal de armazenamento é de 12 a 13% (GERAGE *et al.*, 1982).

As colônias fúngicas precisam para crescer valores de umidade normalmente acima de 13% e quando ocorre o desenvolvimento dos fungos nos grãos de milho armazenados, há uma redução no valor energético do milho, compromete os níveis de vitaminas e ocasiona prejuízos aos níveis de proteínas e aminoácidos. (TINDALL, 1983)

Um dos fatores relevantes para evitar a contaminação por fungos é a umidade do milho, uma vez que esta condição não se apresenta de maneira constante, desde sua colheita até o seu processamento (LAZZARI, 1997).

Experimentos com milho armazenado em nível de 14 e 18% de umidade utilizando 0,5% de ácido propiônico aplicado no milho úmido foi observado efeito

positivo no controle do desenvolvimento de fungos após 62 dias de armazenagem, e as testemunhas contaminadas, tiveram redução em seus níveis de gordura bruta (KRABBE *et al.*, 1995).

#### 4.1.2 Proteína bruta

Com relação ao tratamento com diferentes concentrações da associação de ácidos orgânicos, foi observado que não houve diferença significativa (Anexo IV) com relação às médias da porcentagem da proteína bruta (Tabela 9).

TABELA 9 - Valores médios da porcentagem da proteína bruta de grãos de milho submetidos ao tratamento com diferentes concentrações da associação de ácidos orgânicos (A.A.O. L.t<sup>-1</sup>) em relação aos três períodos de armazenagem (2, 4 e 6 meses).

| A.A.O. (L. t <sup>-1</sup> ) | PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO |         |         |
|------------------------------|---------------------------|---------|---------|
|                              | 2 meses                   | 4 meses | 6 meses |
| 0,0                          | 7,7                       | 7,8     | 7,8     |
| 1,0                          | 8,1                       | 8,1     | 7,8     |
| 1,5                          | 7,8                       | 8,0     | 7,8     |
| 2,0                          | 7,9                       | 8,2     | 7,9     |
| 2,5                          | 7,9                       | 7,9     | 8,4     |

Na pesquisa realizada observou-se que a alteração dos valores da proteína bruta foi pequena considerando as diferentes concentrações da associação dos ácidos orgânicos diante dos 3 períodos de armazenagem.

O ácido propiônico tamponado mostrou uma característica positiva evitando perdas nas porcentagens de proteína bruta (KRABBE *et al.*, 1994a).

#### 4.1.3 Extrato etéreo

O extrato etéreo apresentou uma interação significativa observado no anexo V.

O extrato etéreo não diferiu entre os tempos de armazenagem na testemunha e na concentração de 1,5 L.t<sup>-1</sup>, enquanto que nas concentrações de 1,0 e 2,0 L.t<sup>-1</sup>, o extrato etéreo aos 4 meses de armazenagem foi superior quando comparado aos 2 meses de armazenagem e na concentração de 2,5 L.t<sup>-1</sup>, o extrato etéreo foi superior aos 2 meses de armazenagem quando comparado com 4 e 6 meses.

Aos 2 meses de armazenamento, os valores médios do extrato etéreo na concentração de 2,5 L.t<sup>-1</sup> foram superiores as demais concentrações. Aos 6 meses de armazenamento, a concentração de 2,5 L.t<sup>-1</sup> foi superior a testemunha e não diferiu das demais concentrações (Tabela 10).

TABELA 10 – Valores médios da porcentagem do extrato etéreo de grãos de milho nas diferentes concentrações da associação de ácidos orgânicos em relação aos períodos de armazenamento e os períodos de armazenamento diante de cada concentração da associação de ácidos orgânicos (A.A.O L.t<sup>-1</sup>).

| A.A.O. (L.t <sup>-1</sup> ) | PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO (meses) |          |           |
|-----------------------------|-----------------------------------|----------|-----------|
|                             | 2                                 | 4        | 6         |
| 0,0                         | 4,7 b A                           | 4,7 c A  | 4,5 b A   |
| 1,0                         | 4,6 b B                           | 5,6 a A  | 4,9 ab B  |
| 1,5                         | 4,8 b A                           | 4,9 bc A | 4,9 ab A  |
| 2,0                         | 4,7 b B                           | 5,2 ab A | 4,9 ab AB |
| 2,5                         | 5,8 a A                           | 4,6 c B  | 5,0 a B   |

CV (%) = 4,74

Médias com letras minúsculas iguais, na mesma coluna, e letras maiúsculas iguais na mesma linha, não foram estatisticamente diferentes pelo Teste LSD (P<0,01)

A pesquisa mostrou que o extrato etéreo em relação aos períodos de armazenamento em relação a cada concentração da associação de ácidos orgânicos, teve uma conservação melhor aos 2 meses na concentração de 2,5 L.t<sup>-1</sup> e aos 4 meses nas concentrações de 1,0, 1,5 e 2,0 L.t<sup>-1</sup> da associação de ácidos orgânicos.

Aos 6 meses de armazenamento, a concentração de 2,5 L.t<sup>-1</sup> da associação de ácidos orgânicos teve uma conservação melhor do extrato etéreo em relação à testemunha.

As observações do experimento comprovam os efeitos provocados na melhor conservação do extrato etéreo quando é administrado no milho produto contendo ácido propiônico segundo pesquisa já realizada (PENZ JR. *et al.*, 1993).

O efeito da inclusão do ácido propiônico em milho armazenado por 60 dias e com alta umidade, no início do período de armazenamento, melhora as características do milho, condições de aproveitamento da energia metabolizável e extrato etéreo (KRABBE *et al.*, 1995).

Bartov (1982) observou que quando há desenvolvimento de fungos nos grãos de milho, há perdas nos valores de extrato etéreo e energia metabolizável, pois há danos na fração gordurosa do grão ocasionada pelos fungos. Os fungos como seres vivos necessitam de nutrientes para o seu desenvolvimento.

#### 4.2 DETECÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE FUNGOS

O desenvolvimento de fungos teve um comportamento semelhante nos três períodos avaliados (Figura 02), mostrando um decréscimo de acordo com o aumento das concentrações da associação de ácidos orgânicos administrados (0,0 L.t<sup>-1</sup>; 1,0 L.t<sup>-1</sup>; 1,5 L.t<sup>-1</sup>; 2,0 L.t<sup>-1</sup>; 2,5 L.t<sup>-1</sup>), verificando-se sempre que na testemunha o número de grãos de milho infectados por fungos foi maior.

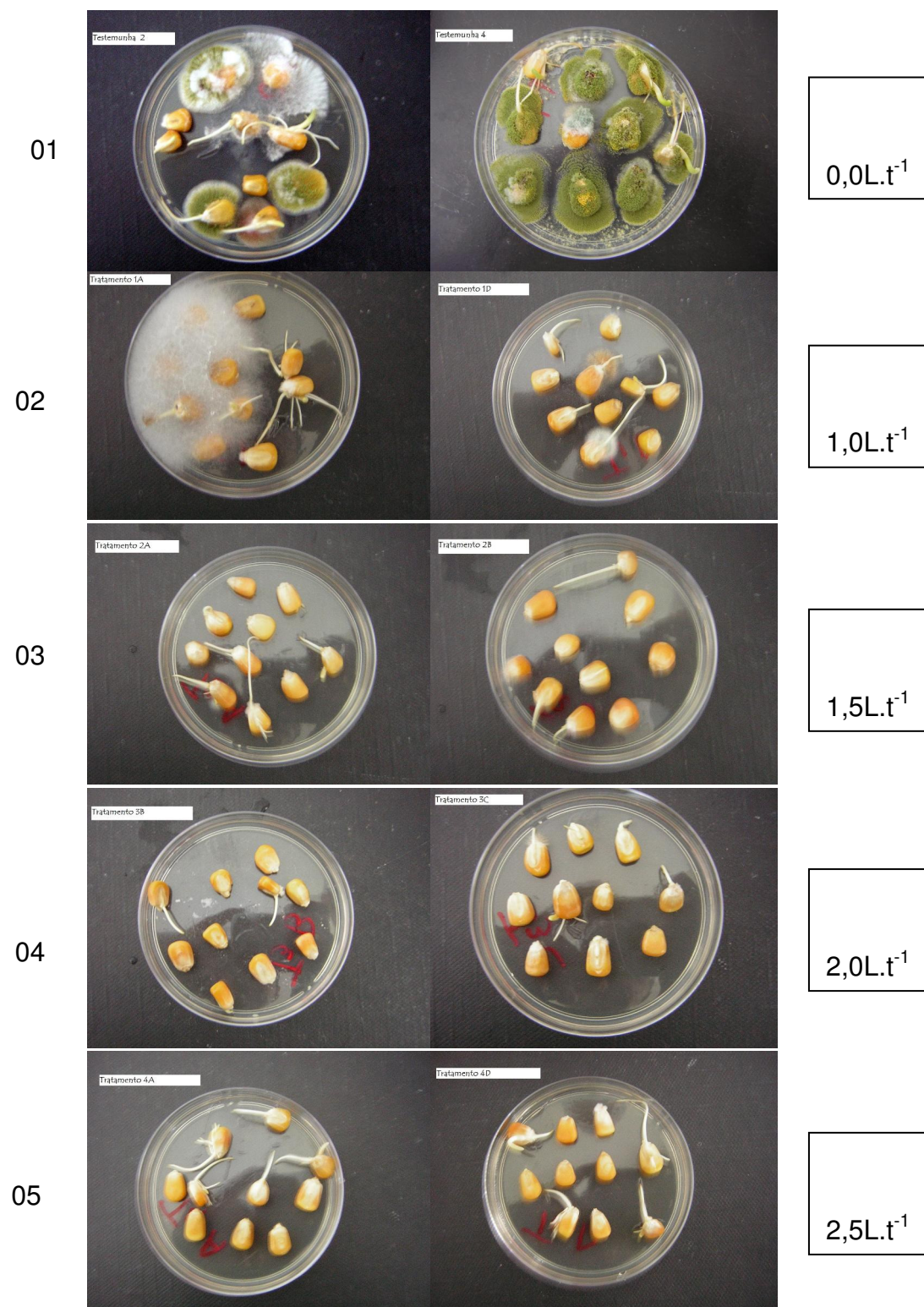


FIGURA 02 – Placas de Petri mostrando o desenvolvimento de fungos em grãos de milho nas concentrações 01= testemunha ( $0,0 \text{ L.t}^{-1}$ ), 02 ( $1,0 \text{ L.t}^{-1}$ ), 03 ( $1,5 \text{ L.t}^{-1}$ ), 04 ( $2,0 \text{ L.t}^{-1}$ ) e 05 ( $2,5 \text{ L.t}^{-1}$ ) da associação de ácidos orgânicos aos 2, 4 e 6 meses de armazenamento.

Os níveis das concentrações estabelecidas como inibidoras para o controle do crescimento dos fungos já tinham sido pesquisadas em milho armazenado em silos (SANTURIO, 1995), o que foi comprovado nas observações com as concentrações da associação de ácidos orgânicos estabelecidas durante o desenvolvimento da pesquisa.

#### 4.3 ANÁLISE DO CRESCIMENTO DE FUNGOS DAS ESPÉCIES OBSERVADAS

O crescimento de fungos foi avaliado calculando o total da porcentagem de fungos por grão de milho infectado das espécies que foram observadas, *Aspergillus ssp*, *Penicillium ssp* e *Fusarium ssp*., sendo que o objetivo da pesquisa foi específica para o *Aspergillus ssp*.

Houve interação significativa na porcentagem do crescimento de fungos analisada (Anexo VI).

Nos tempos de armazenamento, foi observado que a porcentagem de fungos diante das concentrações da associação de ácidos orgânicos, aos 2 meses de armazenamento, as concentrações 1,0 e 1,5 L.t<sup>-1</sup> não foram diferentes, mas diferenciaram da testemunha e das concentrações 2,0 e 2,5 L.t<sup>-1</sup>, as quais apresentaram valores médios da porcentagem do crescimento de fungos menores.

Aos 4 meses de armazenamento, os valores médios da porcentagem de fungos na concentração de 2,5 L.t<sup>-1</sup> diferenciaram das demais concentrações da associação de ácidos orgânicos. Aos 6 meses de armazenamento, a concentração de 2,5 L.t<sup>-1</sup> foi igual à de 2,0 L.t<sup>-1</sup>, mas diferenciou das demais.

Comparando as concentrações da associação de ácidos orgânicos nos 3 períodos de armazenamento, verificou-se que a testemunha (na concentração de 0,0 L.t<sup>-1</sup>), no período de 2 meses de armazenamento diferenciou dos períodos de 4 e 6 meses. Nos períodos de armazenamento, 2 e 4 meses, foi observado que nas concentrações de 1,0, 1,5 e 2,0 L.t<sup>-1</sup> da associação de ácidos orgânicos houve diferença quando foi comparado com o período de 6 meses. Nos 3 períodos de armazenamento, quando foi utilizada a concentração de 2,5 L.t<sup>-1</sup> da associação de ácidos orgânicos, a porcentagem média do crescimento de fungos não apresentou diferença significativa (Tabela 11).

TABELA 11 - Valores médios da porcentagem de todas as espécies de fungos encontradas no milho, *Aspergillus ssp.*, *Penicilium ssp.*, *Fusarium ssp.* em três períodos de armazenamento submetidos ao tratamento com diferentes concentrações da associação de ácidos orgânicos e as concentrações da associação de ácidos orgânicos (A.A.O. L.t<sup>-1</sup>) diante dos períodos de armazenamento

| A.A.O (L.t <sup>-1</sup> ) | PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO (meses) |           |           |
|----------------------------|-----------------------------------|-----------|-----------|
|                            | 2                                 | 4         | 6         |
| 0,0                        | 71,57 a B                         | 79,00 a A | 80,50 a A |
| 1,0                        | 51,50 b A                         | 51,50 b A | 44,50 b B |
| 1,5                        | 50,75 b A                         | 49,75 b A | 41,25 b B |
| 2,0                        | 44,75 c A                         | 47,00 b A | 34,50 c B |
| 2,5                        | 34,50 d A                         | 32,25 c A | 32,25 c A |

CV (%) = 5,30

Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna, e letras maiúsculas iguais na mesma linha, não foram estatisticamente diferentes pelo Teste LSD (P<0,01).

O experimento demonstrou que aumentando as concentrações da associação dos ácidos orgânicos, a porcentagem do número de colônias de fungos infectando os grãos de milho diminuíram comprovando pesquisas anteriormente realizadas conforme referências dos autores abaixo mencionados.

O uso dos ácidos orgânicos parece inibir o desenvolvimento de fungos e potencializar a disponibilidade de nutrientes de matérias primas e rações (PENZ JR. *et al.*, 1993).

A inclusão do ácido propiônico foi efetiva para manter as características do milho e reduzir o crescimento dos fungos (KRABBE *et al.*, 1994a).

Os ácidos orgânicos têm-se mostrado eficientes durante a armazenagem, pois agem diminuindo o pH do conteúdo celular do grão de milho, tornando-o impróprio para o crescimento fúngico (KRABBE, 1994b).

#### 4.4 ANÁLISE DA ESPÉCIE *Aspergillus* .

O fungo de interesse do trabalho estudado foi do gênero *Aspergillus*, que apareceu sempre em maior quantidade infectando os grãos de milho e pode-se observar que todas as concentrações da associação de ácidos orgânicos tiveram atuação na redução da porcentagem do número das colônias fúngicas do *Aspergillus* quando comparadas com a testemunha na concentração 0,0 L.t<sup>-1</sup> (Tabela 12).

TABELA 12 - Valores médios da porcentagem de grãos de milho infectados pelo fungo do gênero *Aspergillus* submetidos à diferentes concentrações da associação de ácidos orgânicos (A.A.O L.t<sup>-1</sup>).

| A.A.O. (L.t <sup>-1</sup> ) | PORCENTAGEM DO <i>Aspergillus</i> |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| 0,0                         | 73 a                              |
| 1,0                         | 48 b                              |
| 1,5                         | 52 b                              |
| 2,0                         | 52 b                              |
| 2,5                         | 50 b                              |

CV (%) = 13,58

Medias com letras iguais, na coluna, não foram estatisticamente diferentes pelo Teste LSD (P<0,01)

A pesquisa novamente demonstrou que à medida que foi aumentada a concentração da associação dos ácidos orgânicos a porcentagem do fungo do gênero *Aspergillus* diminuiu comprovando que os ácidos orgânicos atuam diretamente no grão de milho controlando o desenvolvimento de colônias de fungos existentes (PENZ JR. *et al*, 1993).

No Brasil, um estudo realizado por Castro *et al.* (1995) demonstrou que os fungos mais comumente encontrados em grãos e cereais são *Fusarium spp.*, *Penicillium ssp.* e *Aspergillus ssp.*, entre outros, de maneira que a partir destes, dezenas de micotoxinas já foram detectadas em cereais destinados ao consumo animal, o que configurou os resultados encontrados na pesquisa.

Nos períodos de armazenamento não houve diferença nas médias de porcentagem do crescimento de fungos do gênero *Aspergillus* diante das concentrações da associação de ácidos orgânicos estabelecidas, 0, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 L.t<sup>-1</sup> (Tabela 13).

TABELA 13 - Valores médios da porcentagem dos grãos de milho infectados pelo fungo do gênero *Aspergillus* nos três períodos de armazenamento 2, 4 e 6 meses, em relação as concentrações da associação de ácidos orgânicos utilizadas (0, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 L.t<sup>-1</sup>).

| TEMPOS DE ARMAZENAMENTO (meses) | PORCENTAGEM DO <i>Aspergillus</i> |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| 2                               | 58,9 a                            |
| 4                               | 60,2 a                            |
| 6                               | 56,8 a                            |

CV (%) = 13,58

Médias com letras iguais, na coluna, não foram estatisticamente diferentes pelo Teste LSD (P<0,01)

Foi verificado no trabalho que a inclusão da associação dos ácidos orgânicos fez com que o número de grãos de milho infectados pelas colônias do fungo *Aspergillus* se mantivesse estável nos três períodos de armazenamento.

#### 4.5 IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO *Aspergillus ssp*

O fungo *Aspergillus* grupo *flavus* foi observado isolando a colônia em lamina corada com lactofenol azul de algodão (Figura 03).



FIGURA 03 – Visualização em microscópio óptico, aumento 40 x do fungo *Aspergillus ssp*.

#### 4.6 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE AFLATOXINAS

Com relação à concentração média de aflatoxinas produzidas pelo fungo do gênero *Aspergillus*, avaliada pela metodologia do Teste de ELISA, foi observado que o armazenamento por 2 meses foi significativamente superior ao armazenamento por 4 e 6 meses (Tabela14).

TABELA 14 - Valores médios da concentração de aflatoxinas em grãos de milho infectados nos três períodos de armazenamento.

| TEMPOS DE ARMAZENAMENTO (meses) | CONCENTRAÇÃO DE AFLATOXINAS (ppb) |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| 2                               | 3,246 a                           |
| 4                               | 2,638 b                           |
| 6                               | 2,706 b                           |

CV (%) = 13,73

Médias com letras iguais, na coluna, não foram estatisticamente diferentes pelo Teste LSD (P<0,01).

A concentração de aflatoxinas diante dos tratamentos realizados teve uma diferença significativa e foi verificado que na dosagem de 2,5 L.t<sup>-1</sup> da associação de ácidos orgânicos a concentração desta toxina não foi estatisticamente diferente ao da testemunha e da concentração 1,0 L.t<sup>-1</sup>, mas a concentração de 2,5 L.t<sup>-1</sup> diferenciou das concentrações de 1,5 e 2,0 L.t<sup>-1</sup> da associação de ácidos orgânicos (Tabela 15).

TABELA 15 – Valores médios da concentração de aflatoxinas nos três períodos de armazenamento em grãos de milho submetidas ao tratamento com diferentes concentrações da associação de ácidos orgânicos (A.A.O. L.t<sup>-1</sup>).

| A.A.O. (L.t <sup>-1</sup> ) | CONCENTRAÇÃO AFLATOXINAS (ppb) |
|-----------------------------|--------------------------------|
| 0,0                         | 3,235 ab                       |
| 1,0                         | 3,265 ab                       |
| 1,5                         | 3,295 a                        |
| 2,0                         | 3,397 a                        |
| 2,5                         | 3,038 b                        |
| CV (%) = 13,73              |                                |

Médias com letras iguais, na coluna, não foram estatisticamente diferentes pelo Teste LSD (P<0,01)

Foi verificado na pesquisa que o índice médio da concentração de aflatoxinas nos três períodos de armazenamento foi sempre menor que o nível máximo permitido (20 ppb).

O trabalho produzido demonstrou que a associação de ácidos orgânicos utilizados como produto inibidor, fez com que as aflatoxinas não tivessem um aumento no transcorrer de toda a pesquisa.

A observação acima não concorda com a afirmação de que quando a contaminação de micotoxinas já estiver presente, o uso de produtos inibidores para o desenvolvimento de fungos não tem a devida atuação na destruição das mesmas (KESHAVARZ, 1987).

A mistura de culturas fúngicas pode tanto estimular quanto inibir a formação de micotoxinas, podendo, até mesmo, determinar a degradação de algumas micotoxinas formadas (RAMAKRISHNA *et al.*, 1996). Nas observações do trabalho houve o desenvolvimento de três colônias fungicas.

Na pesquisa realizada, foi observado o desenvolvimento das colônias de fungos que poderiam estar presentes infectando os grãos de milho da amostra coletada, estudar especificamente o fungo da espécie *Aspergillus* e verificar a

evolução de suas toxinas, as aflatoxinas, não se preocupando efetivamente se havia comprometimento das micotoxinas presentes nos animais.

O complemento do trabalho teve como avaliação principal verificar a eficiência de uma associação de ácidos orgânicos no controle do crescimento de colônias fúngicas nos grãos de milho infectados.

## 5 CONCLUSÃO

De acordo com as condições em que a pesquisa foi realizada e os resultados obtidos, conclui-se que:

- 1) A associação de ácidos orgânicos foi eficiente em diminuir o número total de colônias fúngicas encontradas infectando os grãos de milho armazenados.
- 2) A concentração de  $2,5 \text{ L.t}^{-1}$  proporcionou maior controle do crescimento de fungos com 2 e 4 meses de armazenamento.
- 3) Nos 3 períodos de armazenamento, 2, 4 e 6 meses, não houve alteração na concentração de aflatoxinas, independente da concentração de ácidos orgânicos.
- 4) Aos 2 meses de armazenamento, na concentração de  $2,5 \text{ L.t}^{-1}$  da associação de ácidos orgânicos, o extrato etéreo teve uma conservação melhor.

## REFERÊNCIAS

ADEMOYERO, A. A. Mouth lesions in broiler chickens caused by scirpenol mycotoxins. **Poultry Science**, Champaign, v. 70, n. 10, p. 2082-2089, 1991.

ALBUQUERQUE, A. Brasil: confiança em la diversificación de los productos alimenticios. **Alimentos Balanceados para los Animales**, Mount Morris, v. 1, n. 1, p. 75-78, 1994.

BAILEY, R.H.; KUBENA L.F.; HARVEY, R.B.; BUCKLEY S.A.; ROTTINGHAUS, G.E. Efficacy of various inorganic sorbents to reduce toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 78, p. 1391-97, 1999.

BARTOV, I.; PASTER, N.; LISKER, N. The nutritional value of moldy grains for broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 61, p. 2247-2254, 1982.

BEASLEY, J. N.; BLALOCK, L. D.; NELSON, T. S.; TEMPLETON, G. E. The effect of feeding corn molded with *Penicillium lanosum* to broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 59, p. 708-713, 1980.

BOSQUE, I.A.R. Impact of agronomic factors on aflatoxin contamination in preharvest field corn in northeastern Mexico. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, p. 122-129, 1996.

BROWN, T.P.; ROTTINGHAUS, G.L.; WILLIAMS, M.E. Fumonisin mycotoxicosis in broilers: performance and pathology. **Avian Disease**, Kennet Square, v. 36, p. 450-454, 1992.

CASTRO, M.F.P.M.; FURLANI, R.P.Z.; DOERR, J.A. Myoflora, aflatoxigenic species and mycotoxins in freshly harvested corn (*Zea mays L.*): A preliminary study. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 26, p. 289-95, 1995.

DAL BORG, G. Micotoxinas. In: Congresso Brasileiro de Suinocultura, 2, 1980 Campinas; **Anais...**, Campinas: SPMV, 1980, p. 83-84.

DALE, N.; JACKSON, D. True metabolizable energy of corn fractions. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 3, p. 179-183, 1994.

FIORENTIN, L.; FREITAS, A.R.; FIALHO, E.T. **Contaminação por aflatoxinas em milho utilizado na alimentação de suínos**, (Concórdia: EMBRAPA/CNPSA, 1987), (comunicado técnico nº 115), p. 5.

FONSECA, H. Micotoxinas em suinocultura. In: Congresso Brasileiro de Suinocultura, 1980, Campinas, **Anais...**, Campinas: Facta, 1980, p. 85-88.

FRIEND, D.; THOMPSON, B.K.; TRENHOLM, H.L.; PRELUSKY, D. B.; HARTIN, K. E.; MILLER, J. D. A preliminary examination of potential interaction between deoxyvalenol (DON) and other selected *Fusarium* metabolites in growing pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 72, p. 107-116, 1992.

FRISVAD, J.C.; THRANE, U. Liquid column chromatography of mycotoxins. In: Betina, V. (Ed.), **Chromatography of Mycotoxins**: techniques and applications. Amsterdam: **Elsevier Publishers**, 1993, p. 253-372.

GERAGE, A. C.; CARVALHO, A.R.; SILVA, W.R. Colheita e processamento. In: **Fundação Instituto Agronômico do Paraná; O Milho no Paraná**; Londrina, 1982, p. 165-177 (Circular IAPAR, 29).

GIROIR, L. E.; HUFF, W. E.; KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; ELISSALDE, M. H.; WITZEL, D. A.; YERSIN, A. G.; IVIE, G. W. The individual and combined toxicity of kojic acid and aflatoxin in broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 70, n. 6, p. 1351-1356, 1991.

GOURAMA, N.E.BULLERMAN, L.B. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds. A review: **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 12, p. 1395-1404. 1995.

HAMILTON, P. B. Interrelationships of mycotoxins with nutrition. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 36, p. 1899-1902, 1977.

HARVEY, R. B.; ELISSALDE, M. H.; KUBENA, L. F.; WEAVER, E. A.; CORRIER, D. E.; CLEMENT, B. A. Immunotoxicity of ochratoxin A to gilts. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 53, n. 10, p. 1966-1970, 1992.

HUFF, W. E.; KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; PHILLIPS, T. D. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and ochratoxin A. **Poultry Science**, Champaign, v. 71, p. 64-69, 1992.

ITO, N. M. K. Ovos sem casca; possíveis fatores infecciosos. In: Simpósio Técnico de Produção de Ovos, 1994, São Paulo, **Anais...**, Campinas: Facta, 1994, p. 97-115.

JONES, F. T.; HAGLER, W. H.; HAMILTON, P. B. Association of low levels of aflatoxin in feed with productivity losses in commercial poultry operations. **Poultry Science**, Champaign, v. 61, p. 861-868, 1982.

KESHAVARZ, K. Formulação do rações e manejo de alimentação. **Avicultura Industrial**, São Paulo, v. 77, n. 926, p. 27-31, 1987.

KRABBE, E. L.; PENZ JR, A. M.; LAZZARI, F. A.; REGINATTO, M. F. Efeito da umidade e do ácido propiônico sobre as características bromatológicas e microbiológicas de grãos de milho. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola, Santos, 1994. **Anais...**, Campinas: Facta, 1994a, p.27.

KRABBE, E. L.; PENZ JR, A. M.; REGINATTO, M. F.; HARA, C. Efeitos do uso de rações elaboradas com milho armazenado sob diferentes condições no desempenho dos frangos de corte. In: Conferência Apinco Ciência e Tecnologia, Santos, 1994. **Anais...** Campinas: Facta, 1994b, p. 41.

KRABBE, E.L.; JUCHEM, S.; MACIEL, J.E.S; PENZ JR., A.M.; KESSLER, A.M. Efeito das condições de armazenagem de grãos de milho na energia metabolizável aparente para frangos de corte criados com dietas de diferentes qualidades. In: Conferência Apinco Ciência e Tecnologia, Campinas, 1995. **Anais**, Campinas: Facta, 1995, v. 1, p.9-10.

KUBENA, L. F.; HUFF, W. E.; HARVEY, R. B.; YERSIN, A. G.; ELISSALDE, M. H.; GIROIR, L. E.; PHILLIPS, T. D.; PETERSEN, H. D. Effect of hydrated sodium calcium aluminosilicate on growing turkey poults during aflatoxicosis. **Poultry Science**, Champaign, v. 70, p. 1823-1830, 1991.

KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; BAYLEI, R.H.; BUCKLEY, A.S.; ROTTINGHAUS, G. E. Effect of hydrated sodium calcium aluminosilicate (T-Bind™) on mycotoxicosis in young broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 77, p. 1502-1509, 1998.

LANCASTER, M.C; JENKINS, F.P.; PHILP R.D. Toxicity associated with certain samples of groudnuts. **Nature**, London, v. 192, p. 1095-96. 1960.

LAZZARI, F. A. Qualidade da matéria prima de rações de aves: umidade, fungos e micotoxinas. In: Mini Simpósio do Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 7, 1992, Campinas. **Anais ...**, Campinas: CNBA, 1992, p. 77-83.

LAZZARI, F. A. Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações. **2ª ed. do Autor**, Curitiba, v.1, 134 p., 1997.

LESSON, S; DIAZ, G.J.; SUMMERS, J.D. Poultry metabolic disorders and mycotoxins. **University Books**, Guelph, Canadá, p. 94-111, 1995.

LIPPOLD, C.C.; STOTHERS, S. C.; FROHLICH, A. A.; BOILA, R. J.; MARQUARDT, R R. Effects of periodic feeding of diets containing ochratoxin A on the performance and clinical chemistry of pigs from 15 to 50 kg body weight. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 72, p. 135-146, 1992.

LOPES, D. C.; FONTES, R .A.; DONZELE, J. L.; ALVARENGA, J. C. Perda de peso e mudanças na composição química do milho (*Zea mays*, L.) devido ao carunchamento. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 17, n. 4, p. 367-371, 1988.

MARIJANOVIC, D. R.; HOLT. P; NORRED, W. P.; BACON, C. W.; VOSS, K. A.; STANCEL, P. C. Immunossuppressive effects of *Fusarium moniliforme* com culturas in chickens. **Poultry Science**. Champaign, v. 70, n. 9, p. 1895-1901, 1991.

NAZARENO, N. R. X. Controle de doenças. In: Fundação Instituto Agrônômico do Paraná. O milho no Paraná. Londrina, 1982, p. 149-162, (Circular IAPAR, 29).

NORRED, W.P. Fumonins – mycotoxins produced by *Fusarium moliniforme*, **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Washington, DC v. 38, p. 309-328, 1993.

PARK, D.L., LEE, L.S.; PRICE, R.L., POHLAND, A.E. A review of the decontamination of aflatoxins by ammoniation: current status and regulation. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 71, p. 685-703, 1988.

PARKHURST, C. R.; HAMILTON, P. B.; ADEMOYERO, A. A. Abnormal feathering of chickens caused by mycotoxins differing in degree of acetylation. **Poultry Science**, Champaign, v. 71, p. 833-871, 1992.

PENZ JR., A. M.; SILVA, A. B.; RODRIGUES, O. Ácidos orgânicos na alimentação das aves. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola, 1993, Santos. **Anais...**, Campinas: Facta, 1993, p. 111-119.

PINTO, J. H. E.; PSTORE, S. Controle de qualidade matéria prima. In: Simpósio Goiano de Avicultura, 1995, Goiânia. **Anais...**, Goiânia, 1995, p. 11-22.

PITT, L.L.; HOCKING, A.O.; SAMSON, R.A. Recommended methods for mycological examination of foods. In: SAMSON, R.A.; HOCKING, A.O.; PITT, L.L. *et al.* **Modern methods in food mycology**. Amsterdam: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1992, p. 315-368.

PUZZI, D. **Abastecimento e armazenagem de Grãos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1986.

RAMOS, R.J.; HERNANDEZ, E. In situ absorption of aflatoxins in rat small intestine. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 134, p. 27-30, 1996.

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

ROGERS, S. R.; PESTI, G. M.; WYATT, R. D. Effect of tryptophan supplementation on aflatoxicosis in laying hens. **Poultry Science**, Champaign, v. 70, n. 2, p. 307-312, 1991.

ROSTAGNO, H. S. Disponibilidade de nutrientes em grãos de má qualidade. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola, 1993, Santos. **Anais...**, Campinas: Facta, 1993, p. 129-139.

ROTTER, R. G.; THOMPSON B. K.; TRENHOLM, H. L.; PRELUSKY, D. B.; HARTIN, K. E.; MILLER, J. D. A. Preliminary examination of potencial interaction between deoxynivalenol (DON) and other selected *Fusarium* metabolites in growing pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 72, p. 107-116, 1992.

RUIZ, R. L.; CAMARGO, E. C. O. Microbiologia da ração. **Microbiologia Zootécnica**. São Paulo: Roca, 1992, p. 289-307.

SABINO, M. Ocorrência e métodos analíticos para determinação de micotoxinas em grãos e rações. In: Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Micotoxicoses em Aves, 1995, Curitiba. **Anais...**, Campinas:Facta, 1995, p..35-47.

SAMSON, R.A.; HOEKSTRA E.S.; FRISV AO, J.C. **Introduction to food-bome fungi**. 5. ed. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1996.

SANTURIO, J. M. Antifungicos e adsorventes de aflatoxinas em grãos: Quando usá-los? In: Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Micotoxicoses em aves, 1995, Curitiba. **Anais...**, Campinas:Facta, 1995, p. 97-108.

SANTIN, E. Aspectos clinicos, zootécnicos, patológicos e imunológicos em frangos de corte intoxicados experimentalmente com ocratoxina a e vacinados contra a doença de newcastle. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

SAXENA, H. C. Control quality of layer and broiler rations. **Poultry Science**, Champaign, v. 1, n. 6, p. 22-25, 1985.

SCHANG, M. J. Trends in the production of balanced feed with na emphasis on the quality of fullfat soy, corn and sorghum. In: International Technical Symposia, 1992, Ixtapa. **Proceedings**: Ixtapa, 1992, p. 137-145.

SCHEIDELER, S.E. Effects of various of aluminosilicates and aflatoxin B1 on aflatoxin toxicity, chick performance, and mineral status. **Poultry Science**, Champaign, v. 72, p. 282-B, 1993.

SCOTT, P.M. Mycotoxin methodology. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 12, n. 3, p. 395-403. 1995.

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

SHRYOCK, T.R.; KLINK, P.R.; READNOUR, C.E. Effect of bentonite incorporated in a feed ration with tilmicosin in the prevention of induced *Mycoplasma gallisepticum* airsacculitis in broiler chickens. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 38, p. 501-505, 1994.

SMITH, E. E.; KUBENA, L. F.; BRAITHWAITE, C. E.; HARVEY, R. B.; PHILLIPS, T. D.; REINE, A. H. Toxicological evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid in broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 71, p. 1136-1144, 1992.

STANLEY, V.G., OJO, R., WOLDESENBET, S.E., HUTCHINSON, D.H. The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of alatoxicosis in broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 72, p. 1867-1872, 1993.

STRINGHINI, J. H.; LEANDRO, N. S. M.; ORSINE, G. F.; ANDRADE, M. A.; VELOSO, V. R. S.; MESQUITA, S. P. Q. Avaliação de rações formuladas com milho infestado por insetos e fungos para frangos de corte. 1. Milho infestado por insetos e fungos nas rações iniciais (1-28 dia). In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola, 1993, Santos. **Anais...**, Campinas:Facta, 1993, p. 34.

TAYLOR, D.R. Mycotoxin binders: What are they and what makes them work? **Feedstuffs**, Minnetonka, v. 18, p. 41-45, 1999.

TINDALL, W. Molds and feeding livestock. **Animal Nutrition and Health**, July-Aug, p. 5, 1983.

VILELA, H.; SILVA, J. F. C.; VILELLA, D.; SILVESTRE, J. R. A. Alteração do valor nutritivo do grão de milho (*Zea mays*, L.) durante o armazenamento. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 17, n. 5, p. 428-433, 1988.

WYATT, R. D. Sanitary problems associated with the quality of water and feed. I. micotoxins. In: Simpósio Catarinense de Sanidade Avícola, 1, 1985, Chapecó. **Anais...**, Chapecó: EMBRAPA/CNPSA, 1985, p. 21-28.

WYATT, R. D. Puntos para disminuir el impacto de las micotoxinas em la salud y em el rendimiento aviar. **Avicultura Profesional**, Atlanta, v. 11, n. 4, p. 178-180, 1994.

## **ANEXOS**

ANEXO I – Dados relativos à temperatura média, máxima e mínima; umidade relativa média, máxima e mínima durante o armazenamento do milho na câmara de amostras.

| Data     | Temperatura média | T.Max. | T.Min | Umidade relativa do ar (média) | U.Max | U.Min |
|----------|-------------------|--------|-------|--------------------------------|-------|-------|
| 19.04.05 | 22,1              | 26,7   | 22,1  | 72                             | 81    | 59    |
| 26.04.05 | 25,7              | 29,1   | 23,2  | 61                             | 72,1  | 55,7  |
| 03.05.05 | 16,4              | 26,7   | 16,3  | 79                             | 81    | 59    |
| 10.05.05 | 18,2              | 26,7   | 16,3  | 79                             | 82    | 59    |
| 17.05.05 | 21,3              | 26,7   | 16,3  | 72                             | 82    | 59    |
| 20.05.05 | 21,8              | 26,7   | 16,3  | 79                             | 82    | 59    |
| 27.05.05 | 16,4              | 26,4   | 16,0  | 76                             | 84    | 56    |
| 31.05.05 | 16,6              | 26,7   | 16,0  | 82                             | 84    | 56    |
| 08.06.05 | 18,9              | 26,7   | 16,0  | 78                             | 88    | 56    |
| 15.06.05 | 16,3              | 26,5   | 16,0  | 77                             | 84    | 56    |
| 22.06.05 | 16,4              | 26,7   | 16,3  | 78                             | 84    | 56    |
| 28.06.05 | 16,3              | 26,7   | 15,0  | 80                             | 88    | 56    |
| 05.07.05 | 19,1              | 26,7   | 15,0  | 77                             | 88    | 56    |
| 20.07.05 | 13,5              | 26,7   | 12,8  | 72                             | 88    | 56    |
| 29.07.05 | 15,0              | 26,7   | 12,4  | 84                             | 91    | 56    |
| 05.08.05 | 16,2              | 26,5   | 13,1  | 82                             | 88    | 56    |
| 16.08.05 | 19,1              | 26,7   | 13,5  | 77                             | 83    | 57    |
| 19.08.05 | 19,3              | 26,7   | 12,4  | 78                             | 99    | 56    |
| 26.08.05 | 19,1              | 26,4   | 12,8  | 77                             | 95    | 59    |
| 01.09.05 | 16,2              | 26,7   | 16,0  | 82                             | 88    | 56    |
| 06.09.05 | 13,5              | 26,4   | 15,0  | 78                             | 97    | 57    |
| 14.09.05 | 13,3              | 26,7   | 12,4  | 82                             | 91    | 49    |
| 22.09.05 | 13,5              | 26,7   | 16,0  | 77                             | 95    | 58    |
| 28.09.05 | 20,1              | 25,8   | 13,5  | 89                             | 92    | 50    |
| 05.10.05 | 19,8              | 26,7   | 12,4  | 90                             | 95    | 49    |
| 11.10.05 | 20,4              | 26,7   | 12,4  | 83                             | 95    | 49    |
| 20.10.05 | 20,2              | 26,7   | 12,4  | 75                             | 95    | 49    |
| 25.10.05 | 21,2              | 26,7   | 12,4  | 77                             | 95    | 49    |
| 03.11.05 | 19,8              | 26,4   | 12,5  | 77                             | 97    | 49    |
| 10.11.05 | 21,2              | 26,7   | 12,4  | 77                             | 95    | 49    |

ANEXO II - Valores médios da umidade, proteína bruta e extrato etéreo em amostras de milho em três períodos de armazenamento (2, 4 e 6 meses).

| UMIDADE |         |         | PROTEÍNA BRUTA |         |         | EXTRATO ETÉREO |         |         |
|---------|---------|---------|----------------|---------|---------|----------------|---------|---------|
| 2 meses | 4 meses | 6 meses | 2 meses        | 4 meses | 6 meses | 2 meses        | 4 meses | 6 meses |
| 12,4    | 11,3    | 12,9    | 7,7            | 7,8     | 7,8     | 4,7            | 4,7     | 4,5     |
| 12,1    | 11,3    | 12,9    | 8,1            | 8,1     | 7,8     | 4,6            | 5,7     | 4,9     |
| 13,1    | 11,1    | 12,6    | 7,8            | 8,0     | 7,8     | 4,8            | 4,9     | 4,9     |
| 12,7    | 11,2    | 12,9    | 7,9            | 8,2     | 7,9     | 4,7            | 5,2     | 4,9     |
| 12,5    | 11,4    | 12,7    | 7,9            | 7,9     | 8,4     | 5,8            | 4,6     | 5,0     |

ANEXO III – Análise de variância da porcentagem de umidade

| Valor K | Fator                       | GL | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | Valor F  | Probabilidade |
|---------|-----------------------------|----|--------------------|----------------|----------|---------------|
| 2       | Tratamentos (A)             | 4  | 0.271              | 0.068          | 0.5481   | ns            |
| 4       | Tempos de armazenamento (B) | 2  | 26.785             | 13.393         | 108.4833 | 0.0000        |
| 5       | AB                          | 8  | 2.444              | 0.305          | 2.4746   | 0.0258        |
| -7      | Erro                        | 45 | 5.555              | 0.123          |          |               |
| Total   |                             | 59 | 35.056             |                |          |               |

Coeficiente de Variação: 2.88%

ANEXO IV – Análise de variância da proteína bruta

| Valor K | Fator                       | GL | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | Valor F | Probabilidade |
|---------|-----------------------------|----|--------------------|----------------|---------|---------------|
| 2       | Tratamentos (A)             | 4  | 0.704              | 0.176          | 2.0893  | 0.0979        |
| 4       | Tempos de armazenamento (B) | 2  | 0.192              | 0.096          | 1.1381  | 0.3295        |
| 5       | AB                          | 8  | 1.064              | 0.133          | 1.5773  | 0.1586        |
| -7      | Erro                        | 45 | 3.793              | 7.034          |         |               |
| Total   |                             | 59 | 5.753              |                |         |               |

Coeficiente de Variação: 3.65%

ANEXO V – Análise de variância do extrato etéreo

| Valor K | Fator                        | GL | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | Valor F | Probabilidade |
|---------|------------------------------|----|--------------------|----------------|---------|---------------|
| 2       | Tratamentos (A)              | 4  | 1.661              | 0.415          | 7.5457  | 0.0001        |
| 4       | Tempos de armazenamentos (B) | 2  | 0.218              | 0.109          | 1.9769  | 0.1503        |
| 5       | AB                           | 8  | 5.120              | 0.640          | 11.6313 | 0.0000        |
| -7      | Erro                         | 45 | 2.476              | 0.055          |         |               |
| Total   |                              | 59 | 9.474              |                |         |               |

Coeficiente de Variação: 4.74%

## ANEXO VI – Análise de variância da porcentagem de fungos

| Valor K | Fator                       | GL | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | Valor F  | Probabilidade |
|---------|-----------------------------|----|--------------------|----------------|----------|---------------|
| 2       | Tratamentos (A)             | 4  | 12979.132          | 3244.783       | 461.2946 | 0.0000        |
| 4       | Tempos de armazenamento (B) | 2  | 288.172            | 144.086        | 20.4840  | 0.0000        |
| 5       | AB                          | 8  | 593.985            | 74.248         | 10.5555  | 0.0000        |
| -7      | Erro                        | 45 | 316.534            | 7.034          |          |               |
| Total   |                             | 59 | 14177.823          |                |          |               |

Coeficiente de Variação: 5.30%

ANEXO VII – Análise de variância da porcentagem do *Aspergillus*

| Valor K | Fator                       | GL | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | Valor F | Probabilidade |
|---------|-----------------------------|----|--------------------|----------------|---------|---------------|
| 2       | Tratamentos (A)             | 4  | 4850.900           | 1212.725       | 21.4959 | 0.0000        |
| 4       | Tempos de armazenamento (B) | 2  | 1354.233           | 677.117        | 12.0021 | 0.0001        |
| 5       | AB                          | 8  | 839.100            | 104.888        | 1.8592  | 0.0907        |
| -7      | Erro                        | 45 | 2538.750           | 56.417         |         |               |
| Total   |                             | 59 | 9582.983           |                |         |               |

Coeficiente de Variação: 13.58%

## ANEXO VIII – Análise de variância da concentração de aflatoxinas (dados transformados pela raiz quadrada\*10)

| Valor K | Fator                       | GL | Soma dos Quadrados | Quadrado Médio | Valor F | Probabilidade |
|---------|-----------------------------|----|--------------------|----------------|---------|---------------|
| 2       | Tratamentos (A)             | 4  | 0.812              | 0.203          | 1.3146  | 0.2790        |
| 4       | Tempos de armazenamento (B) | 2  | 4.442              | 2.221          | 14.3781 | 0.0000        |
| 5       | AB                          | 8  | 0.961              | 0.120          | 0.777   | ns            |
| -7      | Erro                        | 45 | 6.951              | 0.154          |         |               |
| Total   |                             | 59 | 13.165             |                |         |               |

Coeficiente de Variação: 13.73%