

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS – CAMPUS CASCAVEL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA**  
**SISTEMAS BIOLÓGICOS E AGROINDUSTRIAIS**

**QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE GRÃOS DE MILHO NO**  
**ARMAZENAMENTO INFESTADOS COM *Sitophilus zeamais***

**CRISTIANE LURDES PALOSCHI**

**CASCAVEL**

**2014**

**CRISTIANE LURDES PALOSCHI**

**QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE GRÃOS DE MILHO NO  
ARMAZENAMENTO INFESTADOS COM *Sitophilus zeamais***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, área de concentração: Sistemas Biológicos Agroindustriais - Nível Mestrado, para obtenção do título de Mestre.

**Orientador:** Dr. Divair Christ.

**CASCADEL - PR**

**2014**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P181q Paloschi, Cristiane Lurdes  
Qualidade físico-química e microbiológica de grãos de milho no armazenamento infestados com *Sitophilus zeamais*. / Cristiane Lurdes Paloschi.— Cascavel, 2014.  
70p.

Orientador: Prof. Dr. Divair Christ  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola

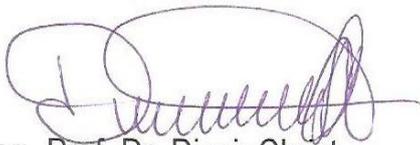
1. Controle de pragas. 2. Micotoxinas. 3. Aflotoxinas. 4. Zea mays. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

CDD 21.ed. 633.15

**CRISTIANE LURDES PALOSCHI**

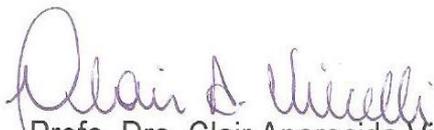
“Qualidade físico-química e microbiológica de grãos de milho no armazenamento infestados com *Sitophilus zeamais*”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação “*Stricto Sensu*” em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Engenharia Agrícola, área de concentração Sistemas Biológicos e Agroindustriais, **aprovada** pela seguinte banca examinadora:



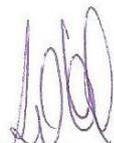
Orientador: Prof. Dr. Divair Christ

Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Unioeste



Profa. Dra. Clair Aparecida Viecelli

Colegiado de Agronomia, PUC



Profa. Dra. Silvia Renata Machado Coelho

Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Unioeste

## BIOGRAFIA RESUMIDA

**Nome Completo:** Cristiane Lurdes Paloschi

**Data e ano de Nascimento:** 24 de julho de 1985

**Naturalidade:** Capitão Leonidas Marques - PR

**Graduação:** Engenharia Agrícola, ano de conclusão – 2011, pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

**Email:** cristianepaloschi@hotmail.com

**Atuação Acadêmica:**

2007 - 2008 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Bolsista voluntário, Carga horária: 20; Projetos de pesquisa: Análise da qualidade tecnológica de variedades de feijão comum submetidos ao envelhecimento acelerado.

2009 - 2010 Vínculo: Bolsista/PIBIC/UNIOESTE/PRPPG, Enquadramento Funcional: Bolsista, Carga horária: 20. Regime: Dedicção exclusiva. Projetos de pesquisa: Análise na qualidade tecnológica em grãos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L) ocasionadas pela infestação do *Zabrotes subfasciatus* durante a armazenagem.

2010 - 2011 Vínculo: Bolsista/ FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA, Enquadramento Funcional: Bolsista, Carga horária: 20. Regime: Dedicção exclusiva. Projetos de pesquisa: Infestação em grãos de feijão por *Zabrotes subfasciatus* durante a armazenagem sob influência do fotoperíodo.

2012: Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, em nível de Mestrado, no Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, na área de Engenharia de Sistemas Biológicos Agroindustriais, na linha de pesquisa de Pós-colheita.

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia, que iluminou meu caminho durante esta caminhada.

Aos meus familiares pela compreensão nos momentos de ausência e pelo carinho recebido em momentos difíceis.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

Aos meus pais em especial, Cacemiro e Ivanir, que compartilharam os meus ideais e os alimentaram, incentivando-me a prosseguir na jornada, fossem quais fossem os obstáculos.

Aos meus irmãos, Jocecley (*in memoriam*) e Alexandre, pelo carinho e apoio que têm dado por todos esses anos.

Aos meus sobrinhos Victor Cláudio e João Pedro, pelos momentos de afetos e alegria que me proporcionam.

Ao professor e orientador Divair Christ, pela amizade e pelo conhecimento adquirido, que tão bem soube transmitir os seus ensinamentos.

Ao CNPQ, pela bolsa de estudos concedida; à CAPES, por financiar através de recursos parte dos materiais necessários a esta pesquisa;

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

## QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE GRÃOS DE MILHO NO ARMAZENAMENTO INFESTADOS COM *Sitophilus zeamais*

**RESUMO:** Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos da infestação dos insetos *Sitophilus zeamais* sobre a qualidade físico-química e microbiológica em grãos de milho durante o armazenamento. Para a condução do experimento, foram coletadas amostras de grãos de milho (*Zeamays*) híbrido da cultivar Dow 2B512Hx, cultivados na região Oeste do Paraná, colhidas em junho/julho de 2013. Para o armazenamento, os grãos se encontravam com teores de água abaixo de 15% b.s sendo armazenados cerca de 300 g em recipientes de vidros fechados com tecido tipo Voil, a fim de facilitar as trocas gasosas, totalizando 40 recipientes armazenados em câmara incubadora B.O.D à temperatura de  $27\pm 1$  °C durante 180 dias. Do total de recipientes, 20 foram infestados com 20 insetos adultos de *Sitophilus zeamais* e os outros 20 foram mantidos sem infestação. A cada 45 dias, foram retiradas as amostras e realizadas análises físico-químicas (perda de massa dos grãos, variação populacional dos insetos, classificação do milho, massa de 1000 grãos, teor de água, cinzas, óleo, proteína e carboidratos e fibra alimentar total), microbiológicas (contagem de fungos filamentosos e identificação dos fungos produtores de aflatoxinas) e de quantificação de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2). A análise exploratória das variáveis respostas foi analisada pelo emprego da análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação de médias foi realizado pelo teste de Tukey com nível de significância de 0,05. O peso final dos grãos em matéria seca com insetos reduziu ao longo do tempo, aumentando as perdas na massa dos grãos, apresentando diferenças estatísticas significativas. A população de insetos e a classificação do milho também apresentaram diferenças estatísticas significativas. Observou-se que, conforme aumentava o tempo de armazenamento, aumentava a população de insetos e reduzia a percentagem de grãos inteiros para ambas as condições de armazenamento. O teor de água, proteína e a incidência de fungos filamentosos aumentaram nos grãos inicialmente infestados ao longo do armazenamento e o peso de 1000 grãos e o teor de carboidratos e fibra alimentar total dos grãos diminuiu nestes grãos em relação aos grãos que não infestados. A incidência de aflatoxinas não foi detectada nos grãos de milho durante o período de armazenamento analisado. Pode-se concluir, com base nesses resultados, que quanto maior o período de contato dos insetos com os grãos maiores são os danos causados e os prejuízos para os produtores, porém o *S. zeamais* não se comportou como um vetor mecânico do fungo *Aspergillus* ssp., não havendo correlação entre a incidência de fungos filamentosos e o nível de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2).

**Palavras-chave:** aflatoxinas, inseto-praga, micotoxinas, *Zeamays*.

# PHYSICO-CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL QUALITY OF CORN KERNELS IN STORAGE INFESTED WITH *Sitophilus zeamais*

**ABSTRACT:** This work aimed to study the effects of infestation of insects *Sitophilus zeamais* on the physicochemical and microbiological quality in corn kernels during storage. For the experiment, samples of hybrid maize (*Zeamays*) were collected from cultivar Dow 2B512Hx, grown in western Paraná, harvested in June / July 2013. For storage, the grains had water contents below 15% bs, and about 300g of them were stored in glass containers closed with tissue type Voil to facilitate gas exchange, with a total of 40 containers stored in a BOD incubator at a temperature of  $27\pm 1$  °C for 180 days. From all the recipients, 20 were infested with 20 adult insects of *Sitophilus zeamais* and the other 20 were kept uninfested. Every 45 days, samples were taken and physical and chemical analyzes were carried out (grain weight loss, population variation of insects, classification of corn, mass of 1000 seeds, water content, ash, oil, protein and carbohydrates and dietary fiber total), as well microbiological analyzes (counting of filamentous fungi and identification of aflatoxin-producing fungi) and quantitation of aflatoxin (B1, B2, G1 and G2). Exploratory analysis of the response variables was done by use of the analysis of variance (ANOVA) and mean comparison test was performed by Tukey's test with a significance level of 0.05. The final grain weight in dry material with insects reduced in the course of time, what increased the losses in grain mass and showed statistically significant differences. The population of insects and the classification of maize also showed statistically significant differences. It was observed that when storage time increased, the population of insects also increased and the percentage of whole grains reduced for both storage conditions. The content of water, protein and filamentous fungi incidence increased in grains initially infested during storage, and the 1000 grains weight, the content of carbohydrates and total dietary fiber content in these grains decreased compared to uninfested grains. The incidence of aflatoxin was not detected in maize kernels during the studied storage period. Finally, from these results, it is possible to conclude that the longer the period of contact of insects with the largest grains, larger the damages and losses to producers are. However, *S. zeamais* did not behave as a mechanical vector of the fungus *Aspergillus ssp.*, with no correlation between the incidence of filamentous fungi and the level of aflatoxins (B1, B2, G1 and G2).

**Keywords:** aflatoxins, pest insect, mycotoxins, *Zeamays*.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>xii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>2</b>
2.1 Geral.....	2
2.2 Específicos.....	2
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
3.1 Características e cultivo do milho.....	3
3.2 Armazenamento e preservação da qualidade dos grãos.....	4
3.3 Qualidade tecnológica, nutricional e microbiológica afetada por inseto-praga.....	7
3.4 Pragas dos grãos de milho: <i>Sitophilus zeamais</i> .....	8
3.5 Fungos.....	10
3.6 Micotoxinas .....	12
3.7 Aflatoxinas .....	15
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
4.1 Amostragem.....	17
4.2 Delineamento experimental.....	17
4.3 Armazenamento.....	18
4.4 Avaliações.....	18
4.4.1 Análise físico-química .....	19
4.4.1.1 Perda de massa dos grãos .....	19
4.4.1.2 Variação populacional dos insetos .....	19
4.4.1.3 Classificação do milho.....	19
4.4.1.4 Massa de 1000 grãos.....	20
4.4.1.5 Determinação do teor de água .....	20
4.4.1.6 Teor de cinzas .....	20
4.4.1.7 Teor de lipídeos .....	21
4.4.1.8 Teor de proteína.....	21
4.4.1.9 Teor de carboidratos e fibra alimentar total .....	21
4.4.2 Análise microbiológica.....	21
4.4.2.1 Contagem de fungos filamentosos .....	21
4.4.2.2 Identificação dos fungos produtores de aflatoxinas .....	22
4.4.3 Análise de quantificação de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) .....	22

4.4.3.1	Determinação de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 .....	22
4.4.3.2	Curvas de calibração .....	22
4.4.3.3	Extração da amostra .....	23
4.4.3.4	Diluição do extrato .....	23
4.4.3.5	Cromatografia de afinidade (coluna) .....	23
4.4.3.6	Derivatização .....	24
4.4.3.7	Condições de análise por cromatografia líquida .....	24
4.4.3.8	Testes de recuperação e limites de detecção .....	24
4.5	Análises estatísticas.....	25
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
5.1	Perda de massa dos grãos de milho .....	26
5.2	Variação populacional de insetos.....	27
5.3	Classificação do milho.....	29
5.4	Massa de 1000 grãos.....	33
5.5	Teor de água.....	34
5.6	Teor de cinzas .....	36
5.7	Teor de óleo.....	37
5.8	Teor de proteína.....	39
5.9	Teor de carboidratos e fibra alimentar total .....	40
5.10	Fungos filamentosos e identificação dos fungos produtores de aflatoxinas.....	41
5.11	Quantificação de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) .....	44
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>48</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Limites máximos de tolerância (expressos em % de massa) para grãos de milho .....	20
<b>Tabela 2</b> - Massa final de grãos de milho híbridos armazenados com e sem população inicial de insetos adultos de <i>S. zeamais</i> , em cinco períodos diferentes: 0, 45, 90, 135 e 180 dias.....	26
<b>Tabela 3</b> - População de insetos de grãos de milho híbridos armazenados com população inicial de insetos adultos de <i>S. zeamais</i> , em cinco períodos diferentes: 0,45, 90, 135 e 180 dias.....	28
<b>Tabela 4</b> - Classificação de grãos de milho híbridos armazenados sem e com população inicial de insetos adultos de <i>S. zeamais</i> , em cinco períodos diferentes: 0, 45, 90, 135 e 180 dias.....	30
<b>Tabela 5</b> - Massa de 1000 grãos de milho híbridos armazenados sem e com população inicial de insetos adultos de <i>S. zeamais</i> , em cinco períodos diferentes: 0, 45, 90, 135 e 180 dias.....	34
<b>Tabela 6</b> - Teor de água em grãos de milho híbridos armazenados sem e com população inicial de insetos adultos de <i>S. zeamais</i> , em cinco períodos diferentes: 0, 45, 90, 135 e 180 dias.....	35
<b>Tabela 7</b> - Teor de cinzas em grãos de milho híbridos armazenados sem e com população inicial de insetos adultos de <i>S. zeamais</i> , em cinco períodos diferentes: 0, 45, 90, 135 e 180 dias.....	36
<b>Tabela 8</b> - Teor de óleo em grãos de milho híbridos armazenados sem e com população inicial de insetos adultos de <i>S. zeamais</i> , em cinco períodos diferentes: 0, 45, 90, 135 e 180 dias.....	38
<b>Tabela 9</b> - Teor de proteína em grãos de milho híbridos armazenados sem e com população inicial de insetos adultos de <i>S. zeamais</i> , em cinco períodos diferentes: 0, 45, 90, 135 e 180 dias.....	39
<b>Tabela 10</b> - Teor de carboidratos e fibra alimentar total em grãos de milho híbridos armazenados sem e com população inicial de insetos adultos de <i>S. zeamais</i> , em cinco períodos diferentes: 0, 45, 90, 135 e 180 dias.....	40
<b>Tabela 11</b> - Número de UFC/g (unidade formadora de colônias por grama) de fungos filamentosos em grãos de milho híbridos armazenados sem e com população inicial de insetos adultos de <i>S. zeamais</i> , em cinco períodos diferentes: 0, 45, 90, 135 e 180 dias.....	43

<b>Tabela 12</b> - Níveis de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) em grãos de milho híbridos armazenados sem e com população inicial de insetos adultos de <i>S. zeamais</i> , em cinco períodos diferentes: 0, 45, 90, 135 e 180 dias.....	45
--	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> -	Fatores que afetam a ocorrência de micotoxinas na cadeia de alimentos. ....	14
<b>Figura 2</b> -	Acondicionamento dos grãos para o armazenamento. ....	18
<b>Figura 3</b> -	Placa de Agar Dextrose Batata com colônias de <i>Aspergillus</i> sp, após 5 dias de incubação.....	42
<b>Figura 4</b> -	Imagem microscópica de hifas de <i>Aspergillus</i> sp. ....	42
<b>Figura 5</b> -	Cromatograma de recuperação das aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2.	45

## 1 INTRODUÇÃO

O milho ocupa posição de destaque no Brasil, é o segundo grão mais produzido sendo superado apenas pela soja. É importante fonte de renda para os produtores e proporciona os nutrientes principais para uma dieta humana e animal, por isso, o desenvolvimento de pesquisas nesta área é importante, a fim de preservar a qualidade dos grãos após a colheita, reduzindo perdas, com conseqüente aumento de ganhos.

A produção desse grão acontece em épocas determinadas do ano, porém o seu consumo é gradual e distribuído ao longo do ano, o que leva à necessidade de seu armazenamento sob condições adequadas. Para que não ocorram perdas qualitativas e quantitativas durante o armazenamento, é importante o monitoramento e controle de alguns fatores, como as condições estruturais dos armazéns, a temperatura e o arejamento na massa de grãos, o teor de água, o desenvolvimento de fungos e a presença de insetos, ácaros, roedores e pássaros.

É importante mencionar que após o seu período de colheita, durante o tempo em que o milho estiver armazenado, devem-se ter cuidados com as pragas de armazenamento, seja ele destinado à utilização como semente ou ao consumo. O gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* é uma das principais pragas dos grãos armazenados, atacando grãos inteiros e sadios, sendo o seu controle de grande importância econômica devido à sua alta agressividade, que provoca perdas significativas na qualidade final dos grãos de milho.

Os prejuízos provocados pelos insetos são verificados na redução do peso, no desenvolvimento de micotoxinas nas quais os insetos podem atuar como vetores mecânicos de fungos, na qualidade alimentícia e no poder germinativo do grão, além da depreciação de seu valor comercial, devido à presença de insetos mortos, ovos e excrementos.

A qualidade dos grãos de milho é alterada direta ou indiretamente quando estes são contaminados por fungos, os quais são indesejáveis nos alimentos, porque são capazes de produzir uma grande variedade de enzimas que, agindo sobre os alimentos, provocam sua deterioração. Além disso, muitos fungos podem produzir metabólitos tóxicos que recebem a denominação de micotoxinas e que, quando ingeridos com os alimentos, causam alterações biológicas prejudiciais tanto aos seres humanos quanto aos animais. Os principais gêneros produtores de micotoxinas são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*.

As micotoxinas frequentemente encontradas no milho são as aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) e, devido ao potencial de risco à saúde humana, têm seus níveis monitorados em muitos países, sendo que a aproximação ideal de controle é a prevenção do crescimento do fungo nos grãos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar os efeitos da infestação dos insetos *Sitophilus zeamais* sobre a qualidade físico-química e microbiológica em grãos de milho híbridos, durante o armazenamento.

### **2.2 Específicos**

- Verificar a população de insetos, durante o armazenamento e as perdas provocadas por estes nos grãos.
- Realizar uma análise de classificação nos grãos devido à infestação e observar se o tempo de armazenamento danifica os grãos.
- Realizar análises físico-químicas para verificar a qualidade nutricional dos grãos de milho, relacionando-o à infestação dos insetos.
- Realizar análise microbiológica nos grãos, quantificando as colônias e os fungos totais presentes.
- Quantificar as aflatoxinas encontradas nos grãos de milho.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Características e cultivo do milho

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

O milho é uma espécie diplóide ( $2n=20$ ), monóica e alógama, pertencente à família Poaceae. Evidências indicam que os povos indígenas americanos iniciaram o cultivo e, conseqüentemente, a domesticação e a seleção do milho há 8.000 ou 10.000 anos, tendo sido a principal cultura de importantes civilizações como, por exemplo, os astecas, os maias e os incas (MACHADO; PATERNIANI, 1998, PATERNIANI; CAMPOS, 1999). Atualmente é cultivado em todas as regiões do mundo.

No Brasil, o milho é o segundo grão mais produzido e sua produção anual é superada apenas pela produção de soja. A produção nacional de milho (primeira e segunda safras) estimada para o ano de 2014 deverá situar-se em 75.183,1 mil toneladas, com variação de 7,8% (CONAB, 2014).

A produção de milho no Brasil tem-se caracterizado pela divisão do plantio em duas épocas. O plantio de verão ou primeira safra é realizado na época tradicional, durante o período chuvoso, que varia entre o fim de agosto, na região sul, e outubro/novembro, no Sudoeste e Centro-Oeste (no Nordeste, esse período ocorre no início do ano). Mais recentemente, tem aumentado a produção obtida na safrinha ou segunda safra. A safrinha refere-se ao milho de sequeiro, plantado extemporaneamente em fevereiro ou março, quase sempre depois da colheita da cultura da soja precoce, predominantemente, na região Centro-Oeste e nos estados do Paraná, São Paulo e Minas Gerais (CRUZ *et al.*, 2011).

A princípio, o cultivo do grão é para atender ao consumo na mesa dos brasileiros, mas essa é a parte menor da produção. O principal destino da safra são as indústrias de rações para animais (BRASIL, 2012b). O uso do milho na alimentação animal é a principal forma de consumo desse cereal, isto é, cerca de 70% do milho produzido no mundo e entre 70 e 80% do milho produzido no Brasil (EMBRAPA, 2013).

Paes (2006) cita que o milho tem extrema importância para a alimentação humana e de animais, devido à sua riqueza de nutrientes, ressaltando que, além do teor expressivo de carboidratos disponível, o óleo obtido do gérmen é rico em ácido graxo ômega 3, com

propriedades funcionais de prevenção de doenças cardiovasculares e controle de dislipidemias.

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

As cultivares de milho disponíveis para o plantio podem ser consideradas do tipo convencional ou transgênicas. Segundo Borém (1999), as cultivares convencionais são classificadas quanto à metodologia de obtenção em dois tipos principais: híbridos e variedades de polinização aberta. As sementes de milho híbrido possuem alto potencial genético de produção, porque essa técnica permite explorar a heterose (superioridade do cruzamento em relação a qualquer um dos pais), também chamada de vigor híbrido (CRUZ *et al.*, 2011). Os híbridos apresentam como vantagens o maior potencial produtivo e a maior uniformidade morfológica e fenológica, as quais facilitam o manejo da cultura (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000).

As variedades de polinização aberta apresentam menor custo inicial e as sementes podem ser utilizadas para outras safras. Conforme afirmaram Cruz *et al.* (2011), em sistemas de produção agroecológicos ou orgânicos, as variedades também são importantes e são preferidas pois, não restringem o uso de híbridos e permitem ao produtor produzir sua própria semente a um preço menor.

De acordo com Godoi (2005), o alto conteúdo de carboidratos, principalmente o amido, além de outros componentes, como as proteínas e os ácidos graxos, torna o milho importante produto comercial. Ele está presente na dieta alimentar humana na forma de: fubá, sucrilhos, milho verde, milho em conserva, pipoca, farinha, amido, flocos de milho, quirera, canjica e outros derivados (MARQUES *et al.*, 2009).

### **3.2 Armazenamento e preservação da qualidade dos grãos**

A definição de armazenamento surge com a observação pelo homem da alternância entre períodos de fartura e de escassez e está diretamente relacionada à necessidade de abastecimento dos povos. O armazenamento foi estabelecido no momento em que o homem primitivo descobriu que podia guardar para uso futuro os produtos disponíveis e excedentes às suas necessidades presentes ou, ainda, para trocá-las com outros homens por produtos os quais não dispunham (RODRIGUES, 2006).

De acordo com Lorine, Miike e Scussel (2002), armazenar é guardar e conservar o produto, diminuindo ao máximo as perdas, utilizando, da melhor maneira possível, as técnicas existentes. A armazenagem é uma das operações pelas quais os grãos passam na sua cadeia produtiva, a qual tem início na escolha da área e da cultivar a ser plantada até chegar ao consumidor final. O armazenamento de grãos é realizado nas unidades armazenadoras que podem ser de dois tipos: a granel (sem embalagens) ou em modelo convencional (sacas).

Devido às entressafras e períodos de seca, os grãos precisam ficar armazenados de um ano a outro, preservando as suas características e a qualidade dos grãos ao longo do tempo, para suprir demandas futuras. Porém, se as condições de armazenamento não forem adequadas, ficam suscetíveis à deterioração e expostos a possíveis contaminações fúngicas, sendo este um dos fatores mais preocupantes na atualidade (TRAVAGLIA, 2011).

A qualidade dos grãos de milho é alterada direta ou indiretamente quando estes são infectados por fungos, pela produção de micotoxinas, que ocasionam danos à saúde humana e animal, em razão da atividade tóxica que podem exercer sobre o organismo (FARIAS *et al.*, 2000, KUMAR; BASU; RAJENDRAN, 2008).

De acordo com Godoi (2005), o milho quando armazenado em condições inadequadas, sofre perdas nos valores quantitativos e qualitativos decorrentes, sobretudo, da infestação de pragas e da contaminação por fungos, desde o campo até a época de consumo. Neste contexto, seria conveniente que a colheita ocorresse logo após a maturidade fisiológica, quando os grãos de milho apresentam máxima qualidade, máximo acúmulo de massa seca e baixa incidência de fungos toxigênicos (EGLI; TEKRONY, 1997, SAINI; WESTGATE, 1999).

Marques *et al.* (2009) afirmam que a antecipação da colheita do milho pode contribuir com o melhor aproveitamento do potencial produtivo dos híbridos, desde que a secagem seja realizada o mais breve possível, visando à manutenção da qualidade sanitária dos grãos de milho. Porém, nesta fase, os grãos ainda apresentam elevado teor de umidade, o que torna inviável a colheita mecanizada, em função da dificuldade de debulha, decorrente do excesso de partes verdes e úmidas das plantas, fato que causa severas injúrias mecânicas por amassamento dos grãos (ALVES *et al.*, 2001).

Por outro lado, o milho colhido com umidades inferiores a 18% tende a perder massa seca no campo, por respiração (BROOKER; BAKKERR-ARKEMA; HALL, 1992). Além disto, os grãos podem sofrer maiores injúrias dos mecanismos de debulha, gerando trincas no endosperma e escarificações no pericarpo do grão ou mesmo a ruptura do endosperma, expondo seu conteúdo à ação de fungos e insetos, com reflexos negativos na potencialidade de armazenamento como, por exemplo, a redução da massa específica e a formação de micotoxinas (FARIAS *et al.*, 2000, RADÜNZ *et al.*, 2006).

A preservação da qualidade dos grãos da colheita à industrialização é fundamental para a manutenção do processo produtivo, pois a qualidade dos grãos é um parâmetro relevante para comercialização e processamento, podendo afetar significativamente o valor do produto final (PONCIANO; SOUZA; REZENDE, 2003, ALENCAR *et al.*, 2009).

Para fins comerciais, a qualidade dos grãos pode ser classificada de acordo com três ou mais das seguintes características: umidade, peso hectolítrico, porcentagem de grãos quebrados ou danificados, porcentagem de materiais estranhos e impurezas, dano por calor ou outros, susceptibilidade à quebra, características de moagem, teor de proteína, teor de óleo, germinação, presença de insetos, contagem de fungos e tipo do grão e outros (SILVA *et al.*, 2000).

De acordo com Brasil (1996), são considerados defeitos em milho os grãos ardidos, brotados, imaturos, fermentados, mofados, chochos, quebrados e fragmentados. Também são considerados defeitos, passíveis de condenação temporária, os grãos com insetos vivos e/ou sementes tóxicas, até que sejam realizados expurgo ou beneficiamento, conforme o caso.

O índice de defeitos na classificação de grãos de milho é considerado como fator de depreciação da qualidade de um lote, sejam eles de origem mecânica, física ou biológica. Além de reduzir a qualidade dos grãos, a presença de grãos quebrados, por exemplo, influencia em muitas ações de compra e venda entre empresas de alimentos e produtos (LAZZARI, 1997).

Segundo Cruz *et al.* (2011), os principais fatores que podem comprometer a qualidade dos grãos durante o armazenamento e demandar monitoramento e controle são: as condições estruturais do armazém ou silo; o arejamento, a temperatura e o volume da massa de grãos; a umidade; o desenvolvimento de fungos e a presença de insetos, ácaros, roedores e pássaros; e o período de estocagem dos grãos.

Lorini (1999) destaca que a inadequada estrutura armazenadora, em geral, grandes armazéns graneleiros com sistema deficiente ou inexistente de controle de temperatura e ausência ou deficiência no sistema de aeração, é um dos grandes fatores que compromete a qualidade dos grãos. O armazenamento sem o monitoramento de temperatura, de umidade e da presença de insetos, também faz com que ocorra um aumento das perdas quantitativas e qualitativas.

A aeração é importante, pois os espaços intergranulares existentes por entre o montante de grãos facilitam este processo e, conseqüentemente, a sua conservação. Se o teor de impurezas estiver presente em quantidades suficientes para a obstrução desses espaços, a passagem de ar diminui, bem como a qualidade do produto. Oliveira, Lorini e Mallmann (2010) acreditam que ambientes mal ventilados contribuem para o rápido desenvolvimento fúngico, contribuindo para condições favoráveis ao seu desenvolvimento.

O alto conteúdo de grãos quebrados no armazém favorece a deterioração da porção sadia, devido à exposição do tegumento a ser decomposto pela atuação de microrganismos. Este processo desencadeia a elevação da temperatura no local em que está inserido, bem como o aumento respiratório dos demais grãos, comprometendo o produto armazenado (POSSAMAI, 2013). Porém, esta deterioração dos grãos pode começar ainda no campo, onde, por conveniência econômica, o produto é mantido na planta até a secagem, prática largamente utilizada pelos agricultores, uma vez que requer o mínimo de investimento. Todavia, esta prática pode resultar no início de elevadas infestações de fungos e de pragas de grãos armazenados (MILLER, 1995, RESNIK *et al.*, 1996, NESCI; RODRIGUEZ; ETCHEVERRY, 2003, REID *et al.*, 2009).

Segundo Silva (2008b), o teor de água é considerado o fator mais importante que atua no processo de deterioração dos grãos armazenados. Se for mantido em níveis baixos, a contaminação por microrganismos será menor e, conseqüentemente, a respiração dos grãos. Para o armazenamento seguro do milho durante 12 meses, o teor ideal de água varia entre 12 e 13% (b.u.), podendo-se ter tolerância máxima de 14% (b.u.), quando aplicada corretamente a técnica de aeração.

Devido à grande utilização deste cereal tanto na alimentação humana quanto animal e sendo a armazenagem uma das etapas da pós-colheita que tem importância fundamental na cadeia produtiva, uma vez que afeta a qualidade do produto final, faz-se necessário avaliar quais condições de armazenamento possibilitam a manutenção da segurança do alimento por um maior período (COSTA *et al.*, 2010).

### **3.3 Qualidade tecnológica, nutricional e microbiológica afetada por inseto-praga**

Os insetos-praga sobrevivem e se multiplicam em grãos e outros produtos armazenados, causando perdas econômicas e requerendo a utilização de métodos de controle adequados para minimizá-las. O caruncho-do-milho (*Sitophilus zeamais*), a traça-dos-cereais (*Sitotroga cerealella*) e o besourinho-broqueador-dos-grãos (*Rhyzopertha dominica*) são exemplos de insetos-praga de grãos de milho armazenados (CRUZ *et al.*, 2011).

De acordo com Neethirajan *et al.* (2007), o ataque de insetos-praga a grãos pode ocasionar tanto perdas qualitativas quanto quantitativas. Os insetos adultos e imaturos se alimentam dos grãos e provocam grandes perdas de massa, do poder germinativo e vigor da semente, além de reduzir o valor nutritivo e comercial dos grãos (SANTOS, 2008).

A infestação por insetos afeta a qualidade dos alimentos que, segundo Wehling, Wetzell e Pedersen (1984), além de reduzir a qualidade das proteínas dos cereais aumenta

a quantidade de ácido úrico, cria más condições higiênicas (SWAMINATHAN, 1977) e reduz a digestibilidade das proteínas (JOOD; KAPOOR, 1992). Para processamento ou consumo, o valor do grão está diretamente relacionado ao nível de contaminação por insetos.

As perdas quantitativas se referem às diminuições de peso e volume, não mostrando adequadamente a degradação nutricional do produto (SILVA; AFONSO; GUIMARÃES, 1995). As perdas de produtos armazenados podem atingir até 30% em alguns casos, das quais 10% são causadas diretamente pelo ataque de pragas durante o armazenamento (SCHÖLLER *et al.*, 1997). A ração feita com grãos de milho que sofreram ataque de insetos tende a diminuir o ganho de peso médio diário, o consumo médio diário, a conversão alimentar dos animais e a razão protéica líquida (BRAGA *et al.*, 2003).

Os insetos, ao perfurarem os grãos e exporem o tegumento, facilitam a entrada de microrganismos como fungos que, iniciam o processo de deterioração do grão, produzindo as micotoxinas (sendo comum a aflatoxina) de extrema toxidez aos homens e animais. As massas de graneleiras comprometidas por estes componentes tóxicos são inviabilizadas para o processamento industrial (PUZZI, 1973). Segundo Aquino e Potenza (2013), o armazenamento de rações contendo pragas primárias e secundárias, associadas aos fungos toxigênicos, representam um risco potencial para a produção de micotoxinas nos substratos e afetam a sanidade dos animais domésticos.

Os principais métodos de controle de insetos-praga de grãos armazenados são os métodos físicos, que são divididos em temperatura, umidade relativa do ar, atmosfera controlada, pós-inertes, remoção física, radiação, luz e som. Destacam-se também os métodos químicos de controle, que ainda são os mais empregados, enfatizando o tratamento preventivo e curativo de grãos (LORINI, 1999).

#### **3.4 Pragas dos grãos de milho: *Sitophilus zeamais***

O *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae), popularmente conhecido como gorgulho-do-milho, é considerado uma das pragas mais importantes no setor de armazenamento de regiões tropicais (FARONI, 1992, SILVEIRA *et al.*, 2006). Suas principais características são: elevado potencial biótico, capacidade de atacar grãos tanto no campo quanto nas unidades armazenadoras e de sobreviver a grandes profundidades, na massa de grãos (FARONI, 1992).

O gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* pertencente à ordem Coleoptera e a família Curculionidae é uma das principais pragas dos grãos armazenados. Os adultos de *S. zeamais* se caracterizam por apresentarem a cabeça projetada a frente dos olhos, formando um rosto bem definido, em cuja extremidade se encontra o aparelho bucal

mastigador. As antenas articulam-se no centro do rosto. O abdômen é coberto por élitros que apresentam quatro manchas amarelo-avermelhadas. Eles medem de 2,5 a 4,0 mm de comprimento e a cor varia de café a negro (OKELANA; OSUJI, 1985).

A fêmea deposita os ovos individualmente no grão, em orifícios que cavam com as mandíbulas. A cavidade é fechada por uma substância gelatinosa secretada pelas glândulas associadas ao ovipositor. Ao se desenvolver, a larva escava um túnel no interior do grão e passa por quatro instares. A fase de pupa ocorre também no interior do grão e o adulto, assim que emerge, cava sua saída para o exterior deixando orifícios (EVANS, 1981).

Além disso, o gorgulho é uma praga primária interna (ataca grãos inteiros, perfurando-os e se desenvolvendo dentro deles) e pode apresentar infestação cruzada (infesta grãos no campo e também os que estão armazenados), tanto na fase adulta como em larva ataca e danifica os grãos e ainda possui diversos hospedeiros (LORINI, 1998, GALLO *et al.*, 2002).

O inseto é um bom voador podendo infestar os grãos antes da colheita e infestar armazéns vizinhos. Vive de 4 a 5 meses em condições ótimas, sendo o ciclo vital de 4 semanas, porém, este ciclo depende da temperatura, umidade relativa do ar e características físico-químicas do grão, como umidade, dureza e disposição de nutrientes. Em temperaturas mais elevadas (30 °C), com umidade do ar de 70% e grãos dentados e macios, com 13,5% de umidade, o ciclo biológico pode ser até 10 dias mais curto em relação ao ciclo normal deste inseto, mas em condições não tão favoráveis ao seu desenvolvimento (SANTOS, 1993, REES, 1996, VENDRAMIM, 2002).

A temperatura ótima de desenvolvimento do *S. zeamais* é em torno de 27 °C, embora possa se desenvolver entre 15 e 34 °C. Infesta, principalmente, o milho, o trigo, o arroz e o sorgo, tendo preferência para ovipositar em milho e trigo, podendo, também, se desenvolver em produtos cereais processados como macarrão ou mandioca desidratada (DOBIE *et al.*, 1984, SANTOS, 2008).

Alimenta-se principalmente do endosperma, onde se encontram grande quantidade dos carboidratos e proteínas de interesse para panificação (gliadina e glutenina) (PINTO *et al.*, 2002). Além desses produtos, Botton, Lorini e Afonso (2005) verificaram a ocorrência de *S. zeamais* na cultura da videira no Rio Grande do Sul, atacando as bagas em fase de maturação. Os autores observaram, também, que todos os parreirais onde foram constatados os danos do inseto, eram próximos a silos ou paióis de milho, que não possuíam o controle desse inseto.

Quanto maior o período de armazenamento dos grãos de milho híbrido na presença de *S. zeamais*, maiores serão as perdas de peso e teor de gordura nos grãos. A exposição dos grãos a longos períodos em contato com os insetos provoca uma grande desvalorização comercial do produto, devido à grande produção de resíduos que é proveniente do aumento da população de insetos (ANTUNES *et al.*, 2011). O milho atacado por estes insetos é

comumente classificado como milho carunchado. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias Moageiras de Milho - ABIMILHO, grãos carunchados são os que estão furados, broqueados e com túneis, denotando dano característico causado por inseto de grãos armazenados (ABIMILHO, 2002).

A escolha da variedade de grãos de milho é de grande importância tanto para a fase do plantio e colheita como para a fase de pós-colheita. Híbridos de milho mais resistentes apresentam menor emergência de insetos adultos *S. zeamais*, assim como a perda de massa seca dos grãos é reduzida e o ciclo biológico leva maior período para se completar (MASARO JÚNIOR *et al.*, 2008).

Em países como os Estados Unidos, onde o gorgulho é considerado um dos insetos-praga mais importantes do milho, há relatos da utilização de cultivares resistentes deste a década de 1990. A utilização destas cultivares chegou a reduzir a infestação, em alguns casos em mais de 40% (VENDRAMIM, 2002).

### 3.5 Fungos

Em virtude de suas características nutricionais e das condições de cultivo e armazenamento, o milho é um substrato muito suscetível à contaminação fúngica, uma vez que o amido é o componente principal do grão (LAZZARI, 1997, BANKOLE; ADEBANJO, 2003, AMARAL *et al.*, 2006).

Segundo Silva (2008b), grãos são suscetíveis ao ataque de fungos durante o crescimento, a maturação e após a colheita. Os fungos são considerados os principais causadores de danos e deterioração nos produtos agrícolas, visto que no combate aos insetos-praga e roedores são empregadas técnicas modernas de controle.

O desenvolvimento de fungos em grãos ou rações pode resultar na produção de micotoxinas, gerando tanto riscos para a economia quanto para a saúde humana e animal (FERRARI FILHO, 2011). Conforme Silva (2008b), os principais danos causados pelos fungos nos produtos agrícolas, durante o armazenamento, são a diminuição na germinação, a descoloração, a produção de toxinas, o aquecimento, transformações bioquímicas, modificações celulares, emboloramento e apodrecimento.

A maioria dos fungos encontrados, naturalmente, em grãos pertence a três gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* e são classificados como fungos de campo e de armazenamento. O gênero *Fusarium* é classificado como fungo de campo, pois, geralmente, ataca as plantas no período de crescimento e maturação, produzindo micotoxinas antes e imediatamente após a colheita, mas algumas espécies podem infectar grãos durante o armazenamento. Já os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são classificados como fungos de

armazenamento, pois são comumente encontrados se desenvolvendo e produzindo suas toxinas em grãos durante o armazenamento com umidade abaixo de 17%. Porém, certas espécies desses gêneros são capazes de infectar grãos no campo (PITT, 2000, RICHARD *et al.*, 2003, SILVA, 2008b). Segundo Ferrari Filho (2011), os fungos do gênero *Fusarium* e *Penicillium* predominam tanto no campo como no armazém em relação ao fungo *Aspergillus*.

O gênero *Aspergillus* tem um grande número de espécies presentes em diversos nichos ecológicos. Embora sejam distribuídos mundialmente, esses fungos são mais comuns em clima subtropical e temperado quente. Entre esses fungos se encontra o *Aspergillus flavus*, que é um fungo produtor de aflatoxinas e é mesofílico, com temperatura ótima para crescimento entre 35 e 38 °C, mínimo entre 8 e 15 °C e máximo entre 40 e 45 °C (DHINGRA; COELHO NETTO, 1998, RICHARD *et al.*, 2003).

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

Machado (1988) reporta que na fase de armazenamento o risco de contaminação de grãos com fungos patogênicos é dependente do controle de fatores ambientais e ressalta que colheitas sob condições úmidas ou executadas com equipamentos desregulados podem propiciar, desde o campo, a associação de fungos, como o *Aspergillus* spp. e o *Penicillium* spp. Esses fungos podem depreciar a qualidade dos grãos quanto ao poder germinativo, pela colonização do embrião; causar descoloração e apodrecimento, com reflexos tanto na viabilidade como no valor comercial e nutritivo dos grãos; aumentar a taxa de ácidos graxos, provocando rancificação de óleos; gerar aquecimento da massa de grãos, devido ao aumento da taxa respiratória e, com isto, uma deterioração mais rápida, além de produzir micotoxinas, substâncias que podem ser letais ao homem e aos animais.

Durante o armazenamento de grãos, o crescimento de fungos depende quase que exclusivamente da umidade relativa de equilíbrio do ar intersticial. A temperatura determina a velocidade de crescimento desses microrganismos nos substratos, como grãos, nozes e rações, desenvolvendo-se melhor em temperaturas entre 10 e 35 °C (DHINGRA; COELHO NETTO, 1998, SILVA, 2008b).

De acordo com Silva (2008b), o melhor método para se evitar a proliferação de fungos em grãos é a secagem do produto, em níveis de teor de água nos quais a disponibilidade de água não seja suficiente para ser utilizada no desenvolvimento desses microrganismos, sendo a combinação baixo teor de umidade e baixas temperaturas o meio mais eficiente para o controle dos fungos durante o armazenamento. Pois, para se evitar ou, ao menos, controlar a proliferação de fungos na massa de grãos é necessário o conhecimento dos fatores que afetam o desenvolvimento desses microrganismos (TRAVAGLIA, 2011).

Algumas espécies de fungos, denominados toxigênicos, podem produzir micotoxinas, substâncias químicas provenientes do metabolismo secundário de diversos fungos, capazes de provocar doenças graves, como tumores cancerígenos. No entanto, somente a presença do fungo toxigênico não implica a produção de micotoxina, visto que dependerá da capacidade de biossíntese do fungo e das condições climáticas existentes, como umidade, temperatura, pH, composição química do alimento e potencial redox (NASCIMENTO *et al.*, 2012, PEREIRA *et al.*, 2002).

### 3.6 Micotoxinas

Desde a descoberta da aflatoxina, o estudo das micotoxinas (do grego *mikes* = fungo, do latim *toxicum* = veneno) vem ganhando importância mundial, principalmente por causarem prejuízos econômicos diretos e indiretos em indústrias de alimentos, tanto animal quanto humano (FONSECA, 1999).

As micotoxicoses ganharam destaque mundial somente em 1960 com a doença “X” dos perus (AMARAL *et al.*, 2006). Esta doença se caracterizou como um dos maiores desastres econômicos ocorridos na Inglaterra, quando cerca de 100.000 perus morreram por causa desconhecida. As aves adoeciam, tornavam-se apáticas, perdiam as forças e morriam em aproximadamente uma semana. Após intensos estudos, verificou-se que as aves morriam por necrose hepática, ocasionada pela ingestão de quantidades significativas de aflatoxina B1, presente na ração oferecida aos animais (CALDAS *et al.*, 2008).

Travaglia (2011) define estas toxinas como moléculas estáveis de difícil degradação e termorresistentes, assim, não são degradadas durante o processamento de alimentos e também da ração, portanto, permanecem nesses produtos e podem contaminar pessoas e animais. As temperaturas elevadas nas quais essas substâncias poderiam ser degradadas são inviáveis para o processamento de alimentos e de ração, pois degradariam esses produtos.

Conforme Taniwaki e Silva (2001), a produção de micotoxinas depende do crescimento fúngico, portanto, pode ocorrer em qualquer época do cultivo, colheita, ou estocagem dos grãos. Contudo, crescimento de fungos e produção de toxinas não são sinônimos, porque nem todos os fungos produzem toxinas. Por outro lado, as micotoxinas podem permanecer no alimento, mesmo depois que os fungos responsáveis tenham morrido.

Jay (2005) define micotoxinas como metabólitos secundários, produzidos por fungos filamentosos. Os metabólitos primários são essenciais ao desenvolvimento e crescimento; os secundários são formados durante o final da fase exponencial de crescimento e não possuem significância aparente. Segundo Freire (2007), em geral, os metabólitos secundários parecem ser formados quando grandes quantidades de precursores de metabólitos primários, tais como aminoácidos, acetato, piruvato e outros são acumulados.

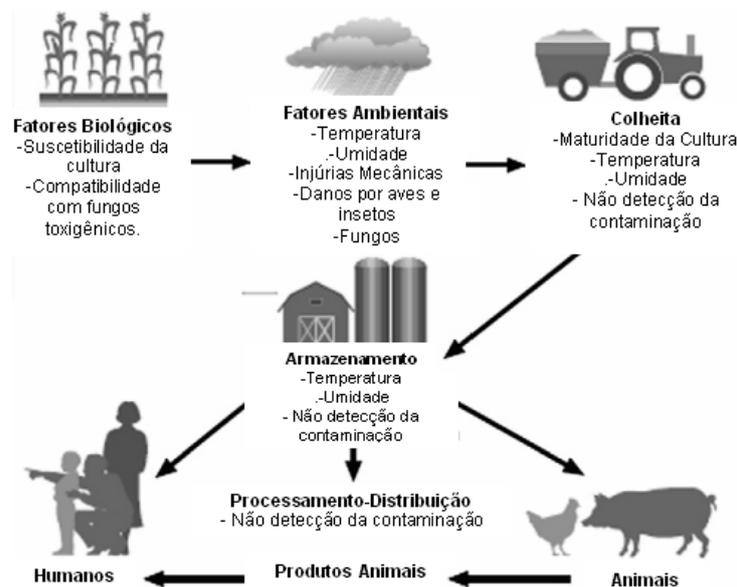
A contaminação fúngica nos grãos de milho ocorre nas fases de pré-colheita em condições favoráveis ao seu desenvolvimento, como temperatura e umidade e ao longo do período pós-colheita, quando o milho não é conservado em boas condições. Elas constituem grande ameaça a toda a cadeia de produção de alimentos e vêm sendo utilizadas como critério de restrição à importação por alguns países e, na comercialização, pelas grandes empresas do setor (CRUZ *et al.*, 2011), pois, uma vez produzidas as micotoxinas podem ser ingeridas, inaladas ou absorvidas pela pele, causando patologia e morte do homem e de animais (CRUZ, 2010).

A ingestão de alimentos (grãos, rações, carnes etc.) contaminados com micotoxinas pode causar, tanto em animais quanto no homem, doenças que são denominadas micotoxicoses, provocando danos como redução no crescimento, interferência no funcionamento dos órgãos vitais do organismo, produção de tumores malignos entre outros (CRUZ *et al.*, 2011). A micotoxicose pode ser do tipo primária ou secundária, sendo que a identificação da micotoxicose secundária pode ser mais difícil, devido aos baixos níveis de toxinas na amostra não resultarem, muitas vezes, em um quadro clínico de micotoxicose específica, mas sim num quadro de suscetibilidade exacerbada a infecções intercorrentes, devido à imunossupressão ocasionada pela toxina (OSBORNE, 1982).

A ocorrência de micotoxinas se deve principalmente a dois fatores: a biodisponibilidade de nutrientes e as condições de armazenamento do grão (temperatura e umidade) que favorecem o crescimento de determinados microrganismos produtores destes compostos (MACHINSKI JUNIOR *et al.*, 2001, AMARAL *et al.*, 2006). Além da toxigenicidade dos fungos, da umidade e da temperatura, o substrato também é um fator determinante para a produção de micotoxinas pelos fungos (SMITH; MOSS, 1985, TUBAJIKA *et al.*, 2000, MARVIN; KLETER, 2009).

A Figura 1 apresenta o ciclo dos fatores que influenciam na ocorrência de micotoxinas na cadeia de alimentos, podendo ser observado que a temperatura e a umidade

são fatores importantes para o desenvolvimento das micotoxinas e que estas podem desenvolver-se ainda na lavoura e, quando não detectadas nas diversas etapas do ciclo, prosseguem na cadeia alimentar até serem ingeridas pelos humanos.



**Figura 1** - Fatores que afetam a ocorrência de micotoxinas na cadeia de alimentos.

Fonte: Paterson e Lima (2010).

Dentre as micotoxinas frequentemente encontradas no milho estão as aflatoxinas e ocratoxina, produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*; as fumonisinas e zearalenona, produzidas por fungos do gênero *Fusarium* (ALI; YAMASHITA; YOSKIZAWA, 1998, MACHINSKI JUNIOR *et al.*, 2001, MORENO *et al.*, 2009). Os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* se comportam de maneira diferenciada, em função dos teores de umidade nos grãos de milho (MARQUES *et al.*, 2009). As aflatoxinas são as que possuem maior potencial de danos à saúde humana, porém, outro grupo de micotoxinas merece destaque, as fumonisinas, que têm sido relacionadas à ocorrência de câncer de esôfago em humanos (CRUZ *et al.*, 2011).

Considerando a presença frequente destes metabólitos secundários nos grãos de milho e, conseqüentemente, em seus derivados, é importante a monitorização de toda a cadeia produtiva, com o intuito de evitar que se instalem as condições ideais para o desenvolvimento destes fungos e a posterior produção de micotoxinas na massa de grãos, uma vez que as indústrias de ração e de alimentos estão cada vez mais exigentes, tanto para aumentar produtividade como para obter alimentos seguros e com qualidade. Segundo Santin (2000), a melhor forma de impedir as perdas nutricionais e a produção de micotoxinas está no controle de crescimento dos fungos, pelo controle das matérias-primas desde o cultivo no campo até o armazenamento.

### 3.7 Aflatoxinas

A produção de aflatoxinas nos grãos de milho pode ocorrer quando os grãos estão presos às espigas ou no campo, pelas condições favoráveis aos patógenos e ao longo do período pós-colheita. Os três principais tipos de matéria-prima alvo das aflatoxinas são o milho, o algodão e o amendoim. As perdas econômicas ocasionadas por aflatoxicoses em animais também são significativas e variáveis (CRUZ *et al.*, 2011).

Aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos na degradação do alimento através de suas enzimas. Conforme a *European Mycotoxin Awareness Network - EMAN*, conhecem-se 20 tipos de aflatoxinas e seus derivados isolados (EMAN, 2007). Porém, as aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> continuam sendo as mais estudadas e de maior relevância, sendo que a sua biotransformação, em diversas espécies animais, resulta na produção de M1 e M2 (OLIVEIRA; GERMANO, 1997, MALLMANN *et al.*, 2006).

As aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>) são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* spp., principalmente pelas espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, apresentando nos humanos propriedades oncogênicas e imunossupressivas, induzindo infecções com facilidade nas pessoas, e reduzindo a imunidade em animais como perus, frangos e suínos (FREIRE, 2007). O *A. flavus* produz apenas aflatoxinas do grupo B, enquanto as outras duas espécies produzem aflatoxinas dos grupos B e G (CREPPY, 2002).

O metabólito mais importante é a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), devido à sua elevada hepatotoxicidade e maiores concentrações nos substratos. As aflatoxinas são comumente encontradas em diversos alimentos utilizados para animais de produção, principalmente em grãos (MALLMANN; SANTURIO; WENTZ, 1994, ZLOTOWSKI *et al.*, 2004).

Segundo Freire (2007), estudos realizados no Brasil encontraram níveis de contaminação por micotoxinas em alimentos, que são bases para rações animais, em quantidades superiores ao permitido pela legislação brasileira. A legislação do Ministério da Saúde (RDC n.º 7, de 18 de fevereiro de 2011) preconiza que os limites máximos a serem tolerados (LMT) para as micotoxinas no Brasil, em milho e seus subprodutos, são 20 µg/kg para a soma das aflatoxinas B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub>+G<sub>1</sub>+G<sub>2</sub>, 10 µg/kg para a ocratoxina A, 2500 µg/kg para a soma das fumonisinas B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub> e 300 µg/kg para a zealarenona (BRASIL, 2012a).

O sinal de intoxicação por aflatoxinas depende, principalmente, de sua concentração no alimento, do tipo de aflatoxina e do tempo de ingestão. São toxinas potentes ao fígado e a maioria das espécies animais expostas a estas micotoxinas mostram sinais da doença que variam de agudo (letais ou não) a subagudos. O efeito agudo é de manifestação e de percepção rápidas, causando reações irreversíveis e podendo levar o animal à morte, como

resultado da ingestão de doses geralmente elevadas. O efeito subagudo é o resultado da ingestão de doses não elevadas que provoca distúrbios e alterações em alguns órgãos, tanto em humanos como em animais, especialmente no fígado. Ambos os casos dependem da espécie animal, idade, estado nutricional e também do sexo (TEIXEIRA, 2008).

Em saúde pública as aflatoxinas têm sido associadas à etiologia de neoplasias hepáticas em humanos, mediante a ingestão de alimentos contaminados. Além disso, evidências demonstraram que as aflatoxinas podem estar associadas ao desencadeamento de outras doenças, tais como a síndrome de Reye, causa de encefalopatias e o Kwashiorkor, forma severa de desnutrição (OLIVEIRA; GERMANO, 1997).

Segundo Oliveira *et al.* (2011), a contínua ingestão de aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>) por animais em lactação deixa resíduos no leite, com uma taxa de transferência média da ração para o leite de 1,7%. Deste modo, as aflatoxinas afetam toda cadeia, pois o leite será ingerido pelo homem, o que além de ser um problema econômico para as propriedades rurais, devido às perdas em termos de animais e produção, também é um problema de saúde pública, pois a ingestão de micotoxinas por humanos pode gerar uma série de danos à saúde como os supracitados.

O ideal é que a contaminação em alimentos por aflatoxinas seja prevenida, utilizando boas práticas agrícolas, de transporte, de manufatura e de armazenagem. Assim, estratégias e instrumentos legais, necessários na agricultura e na indústria de alimentos, podem assegurar a qualidade dos produtos de origem animal e vegetal (FERREIRA *et al.*, 2006).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Amostragem

A pesquisa foi desenvolvida nos laboratórios da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE): Laboratório de Controle de Qualidade (LACON), no Laboratório de Armazenagem e Protótipos de Instalações de Secagem (LAPIS) e Laboratório de Biosistemas Agrícolas (LABA), localizados no *campus* de Cascavel - PR.

Foram utilizadas amostras de grãos de milho (*Zeamays*) híbrido da cultivar Dow 2B512Hx de ciclo precoce, textura semiduro e cor alaranjada, cultivados na região Oeste do Paraná, colhidas de junho/julho de 2013, referentes à segunda safra, ou seja do milho safrinha. As amostras estavam armazenadas em uma Cooperativa no município de Cascavel - PR, onde, logo após a recepção dos grãos, foram secados em secador para a obtenção de teor de água abaixo de 13% b.u que, de acordo Cruz *et al.* (2011), é considerado seguro para o armazenamento.

As amostras foram transportadas para os laboratórios da UNIOESTE, onde foram retiradas as impurezas e as matérias estranhas por um processo de peneiramento da massa de grãos. A desinfestação inicial foi realizada conforme indicado por Brasil (2009), por meio de congelamento, o qual consiste na manutenção das amostras em freezers a - 20 °C, por 3-5 horas, acondicionadas em sacos de polietileno limpos.

### 4.2 Delineamento experimental

O experimento foi montado em delineamento com parcelas subdivididas (Split-Plot), sendo o fator primário o tratamento com dois níveis (com e sem inseto), e o fator secundário o período de armazenamento (0, 45, 90, 135, 180 dias), com quatro repetições para cada tratamento.

### 4.3 Armazenamento

Os grãos foram acondicionados em recipientes de vidros com capacidade para 0,530 mL. Em cada recipiente foram colocados 300 g de grãos de milho, totalizando 40 amostras.

Os recipientes foram fechados com tecido tipo Voil, a fim de facilitar as trocas gasosas; 20 amostras foram submetidas à infestação de 20 insetos adultos de *Sitophilus zeamais* (Gorgulhos dos cereais) e as outras 20 não foram submetidas a nenhum tipo de infestação. As amostras (com e sem insetos) foram armazenadas por um período de 45, 90, 135 e 180 dias em câmara incubadora B.O.D, marca Fanem, a uma temperatura de  $27\pm 1$  °C, considerada temperatura ideal para o desenvolvimento do gorgulho, de acordo com Santos (2008).



**Figura 2** - Acondicionamento dos grãos para o armazenamento.

### 4.4 Avaliações

Os grãos armazenados foram avaliados quanto às características físico-químicas em base seca (perda de massa dos grãos, variação populacional dos insetos, classificação do milho, massa de 1000 grãos, teor de água, cinzas, óleo, proteína, carboidratos e fibra

alimentar total), microbiológicas (contagem de fungos filamentosos e identificação dos fungos produtores de aflatoxinas) e de quantificação de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) logo após o início do armazenamento (tempo 0) e, periodicamente, aos 45, 90, 135 e 180 dias. Após as avaliações da perda de massa, variação populacional, classificação dos grãos de milho, massa de 1000 grãos e teor de água, foi realizada a retirada dos insetos presentes e os grãos foram moídos em moinho de facas, marca TECNAL (TE 631/3).

#### **4.4.1 Análise físico-química**

##### **4.4.1.1 Perda de massa dos grãos**

Com o uso de balança semianalítica (precisão de 0,01 g), marca GEHAKA (modelo BG 1000), pesaram-se os frascos de vidro e os grãos de milho necessários para cada repetição e, ao final de cada período de armazenamento, novamente os grãos de milho foram pesados.

##### **4.4.1.2 Variação populacional dos insetos**

A variação populacional de insetos foi determinada pelo número de insetos sobreviventes, emergidos e mortos, a partir do número inicial que foi de 20 insetos adultos de *S. zeamais*.

##### **4.4.1.3 Classificação do milho**

Os defeitos (grãos ardidos, chochos, germinados, fragmentados, quebrados, carunchados, mofados ou fermentados e matérias estranhas/impurezas) foram determinados pela metodologia oficial do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1996). Os resultados estão expressos em percentagem de grãos inteiros.

A classificação dos grãos de milho foi realizada segundo o novo padrão de classificação que entrou em vigor no dia 1º de setembro de 2013, conforme a Tabela 1 (BRASIL, 2009b).

**Tabela 1** - Limites máximos de tolerância (expressos em % de massa) para grãos de milho

Tipificação	Grãos avariados		Grãos quebrados	Matérias estranhas e Impurezas	Carunchados
	Mofados e Ardidos	Total			
Tipo I	1,0	6,0	3,0	1,0	2,0
Tipo II	2,0	10,0	4,0	1,5	3,0
Tipo III	3,0	15,0	5,0	2,0	4,0
Fora de Tipo	>3,0	>15,0	>5,0	>2,0	>4,0

#### 4.4.1.4 Massa de 1000 grãos

A massa de 1000 grãos foi determinada seguindo-se a metodologia definida em normas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para análise de sementes (BRASIL, 2009a), realizando-se a contagem de 100 grãos de cada repetição e pesados em balança analítica da marca GEHAKA (modelo Ag 200). Os resultados foram multiplicados por dez e são expressos em gramas.

#### 4.4.1.5 Determinação do teor de água

A determinação do teor de água dos grãos foi realizada pelo método da estufa, através da metodologia também definida em normas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para análise de sementes (BRASIL, 2009a).

Foram pesados 10 gramas de amostra de cada tratamento e levadas para estufa de secagem com ventilação forçada, marca TECNAL (modelo TE – 394/2), em temperatura de  $105 \pm 3$  °C, por 24 h. Após este período as amostras foram retiradas, deixando-as resfriar em dessecador até atingirem temperatura ambiente e posteriormente novamente pesadas. A determinação do teor de água das amostras se deu por diferença de massas.

#### 4.4.1.6 Teor de cinzas

O teor de cinzas das amostras foi obtido pelo método de incineração em mufla a 550 °C, conforme normas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2012). Foram pesados 2 g da amostra em cápsula de porcelana, colocados em mufla, em temperatura de 550 °C até a eliminação completa do carvão; as cinzas encontravam-se brancas ou ligeiramente acinzentadas. A determinação do teor de cinzas se deu por diferença de massas.

#### **4.4.1.7 Teor de lipídeos**

O teor de lipídios das amostras foi determinado através de técnica de extração direta em Soxhlet, conforme normas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2012). Foram pesados 2 g da amostra em cartuchos de papel filtro, os quais foram colocados em aparelho extrator tipo Soxhlet, marca Tecnal (modelo TE 004). Adicionavam-se 100 ml de éter de petróleo em um balão de fundo chato (reboiller), previamente tarado e acoplado ao aparelho. Após o período de aquecimento e destilação do éter, o reboiller era levado à estufa e resfriado em dessecador até temperatura ambiente. O teor de lipídios foi determinado por diferença de massas.

#### **4.4.1.8 Teor de proteína**

Para a determinação do teor de proteínas, foram utilizados 0,2 g de cada amostra, colocados na chapa digestora em capela para a digestão da proteína. Após a digestão, cada amostra foi levada ao destilador de nitrogênio, marca Tecnal (Modelo TE 0363), e titulada. O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldhal e o teor de proteína obtido pelo fator de conversão de 6,25, conforme normas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2012).

#### **4.4.1.9 Teor de carboidratos e fibra alimentar total**

O teor de carboidratos foi calculado pela diferença entre 100 e a soma das porcentagens de água, proteína, lipídeos totais (teor de óleo) e cinzas. Os valores de carboidratos incluem a fibra alimentar total, conforme indicado na Tabela brasileira de composição de alimentos -TACO (UNICAMP, 2011).

### **4.4.2 Análise microbiológica**

#### **4.4.2.1 Contagem de fungos filamentosos**

A contagem de fungos filamentosos UFC.g<sup>-1</sup> foi realizada segundo Silva, Junqueira e Silveira (2007).

Foram pesados 25 g de milho triturado e homogeneizado em 225 mL de água peptonada (0,1%). Em seguida, foram preparadas diluições decimais até 10<sup>-3</sup>. Inocularam-se alíquotas de 0,2 mL de cada diluição sobre a superfície de placas contendo Agar Dextrose Batata (ADB) acidificado com ácido tartárico a 10% para atingir pH 3,5 ± 0,1, as quais foram

incubadas por 5 dias a 25 °C em câmara incubadora BOD, marca Tecnal (TE 391). Em seguida, procedeu-se à contagem de UFC.g<sup>-1</sup>, contabilizando as colônias de fungos filamentosos.

#### **4.4.2.2 Identificação dos fungos produtores de aflatoxinas**

A identificação de fungos aflatoxigênicos foi realizada pela técnica de microcultivo, de acordo com Brasil (2004).

Em uma placa de Petri esterilizada, com um fundo composto por papel filtro qualitativo, foram colocadas duas lâminas também estéreis, sendo uma suporte para a outra, na qual foi adicionado um cubo de ADB, onde foram semeadas partes da colônia. Este cubo estava disposto sobre a lâmina, coberto com lamínula esterilizada. Foi feita uma câmara úmida ao fundo da placa de Petri, adicionando-se 1 a 2 mL de água destilada também estéril. A placa foi tampada e incubada por um período de 3 a 5 dias a 25 °C. Após o período de incubação, a lamínula foi retirada com o auxílio de pinça e pingou-se uma gota do corante Lactofenol-algodão, montada sobre outra lâmina.

Foram observadas em microscópio óptico com objetiva de 40 X as características como tipo, cor e disposição das hifas septadas ou cenocítica, hialina ou demácia e formação de esporos.

#### **4.4.3 Análise de quantificação de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2)**

##### **4.4.3.1 Determinação de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2**

Foi realizada a determinação de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> utilizando-se colunas de imunoafinidade, seguidas por injeção em HPLC (marca Shimatzu), pelo método oficial da AOAC 991.31 (AOAC, 1982), recomendado pelo fabricante das colunas de imunoafinidade Aflatest ® (Vicam).

##### **4.4.3.2 Curvas de calibração**

Os padrões das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, adquiridos da *Sigma Aldrich*, foram dissolvidos em metanol grau CLAE e preparadas novas diluições (soluções de trabalho) na ordem de µg.mL<sup>-1</sup>. A partir das concentrações obtidas de cada solução de trabalho, foi possível calcular a próxima diluição, objetivando a obtenção de padrões de concentração na ordem de 0,025; 0,05, 0,075; 0,1 e 0,125 µg.mL<sup>-1</sup>, necessários para preparação das curvas

de calibração para as aflatoxina B1, B2, G1 e G2 no equipamento de CLAE ,observando-se a linearidade de resposta.

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, dentro de uma determinada faixa de concentração. É recomendado que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco diferentes concentrações e que o coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) esteja o mais próximo possível de 1,0, o que demonstra uma menor dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor incerteza dos coeficientes de regressão estimados.

Obtidas as curvas de calibração, foram calculadas as concentrações das amostras por análise de regressão, utilizando-se as equações lineares.

#### **4.4.3.3 Extração da amostra**

Em um erlemeyer foram adicionados 25 g da amostra, 5 g de sal (NaCl) e 125 mL de metanol: água (70:30). Este extrato foi colocado em uma mesa agitadora orbital, marca Tecnal (modelo TE 141), por 1 h em rotação máxima.

Em seguida, foi passado em um filtro de papel plissado qualitativo, com auxílio de um funil e coletado em frasco de vidro âmbar.

#### **4.4.3.4 Diluição do extrato**

Para a diluição do extrato, pegou-se 15 mL do extrato filtrado que foi diluído em 30 mL de água ultrapurificada e colocado no tubo de centrifugação, tipo Falcon. Em seguida, foi levado à centrífuga por 14 minutos: 10 minutos de aceleração, 3 minutos de frenagem, a 25 °C e 3360 Força Centrífuga Relativa (RFC).

O extrato diluído foi filtrado em filtro de microfibras de vidro, com auxílio de um funil e coletado em frasco de vidro âmbar.

#### **4.4.3.5 Cromatografia de afinidade (coluna)**

Para a cromatografia foram passados 15 mL do extrato filtrado (15 mL = 1g da amostra) completamente através de uma coluna de imunoafinidade Aflatest-P, a um fluxo de cerca de 1 a 2 gotas/segundo até que o ar passasse completamente pela coluna, em aparelho manifold, acoplado a uma bomba de vácuo, marca Tecnal (modelo TE 058).

A coluna foi lavada com 20 mL de água ultrapurificada, a um fluxo de cerca de 2 gotas/segundo.

As aflatoxinas foram eluídas da coluna de imunoafinidade pela passagem de 1,0 mL de metanol grau HPLC através da coluna, a um fluxo de cerca de 1 a 2 gotas/segundo e coletada toda a amostra eluída (1,0 mL) em uma cubeta de vidro tipo frasco âmbar.

#### **4.4.3.6 Derivatização**

Na derivatização, foram transferidos 200 µL do extrato purificado (eluato) e adicionado 700 µL do reativo de derivatização: ácido trifluoracético: ácido acético: água, na proporção de 20:10:70. O eluato foi coletado em um frasco âmbar e agitado manualmente por 30 vezes.

O eluato foi colocado em banho-maria por 9 min a 65 °C, deixado esfriar e colocado em aparelho de ultrassom para desgaseificação à frequência de 80 Hz, 100% de potência, por 10 minutos. Em seguida, foi filtrado em filtro de seringa com auxílio de uma seringa de 5 mL, coletado num frasco âmbar e seguiu-se para injeção em coluna cromatográfica.

O volume injetado no HPLC foi de 20 µL. O tempo de corrida foi de 15 min por amostra. As amostras saíram em duplicata e foi realizada a média.

#### **4.4.3.7 Condições de análise por cromatografia líquida**

As condições foram: temperatura: 40 °C; coluna: 4,6 mm X 25 cm, 5 µm, C18 (Kromasil); fase móvel: metanol: água (40:60), isocrática desgaseificada e detector de fluorescência: excitação 365 nm, emissão 450 nm.

#### **4.4.3.8 Testes de recuperação e limites de detecção**

O desempenho analítico da metodologia foi realizado pela avaliação dos limites de detecção e recuperação.

O teste de limite de detecção foi realizado com 18 soluções, com concentrações que variaram de  $2,5 \times 10^{-6}$  até  $0,025 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , utilizando uma solução mãe de concentração  $0,5 \mu\text{g.mL}$  de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e feita uma curva padrão para as aflatoxinas.

Para avaliação da exatidão da metodologia, testes de recuperação foram realizados, em que amostras de milho com e sem infestação foram contaminadas com  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ , com as quatro aflatoxinas, em triplicata. Em seguida, realizou-se a extração e a quantificação destas.

#### 4.5 Análises estatísticas

A análise exploratória das variáveis respostas foi realizada pelo emprego da análise de variância (ANOVA), em que se consideraram significativas as diferenças cujo valor de significância foi inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ). O teste de comparação de médias foi realizado pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o *software* R, versão 3.0.1. O teste de normalidade foi realizado pelo teste de aderência de Shapiro-Wilk, aceitando a hipótese de normalidade para p-valor superior a 0,05 ( $p > 0,05$ ).

Para a análise estatística dos resultados de emergência, mortalidade de insetos e classificação de grãos carunchados com insetos, os dados foram transformados em raiz de  $(x + 1)$ ; para a análise dos resultados de total de insetos, grãos fragmentados, mofados, inteiros, quebrados, perda de massa, massa de 1000 grãos e teor de água os dados foram transformados em raiz de  $x$ ; para a análise do número de unidades formadoras de colônias por grama os dados foram transformados em  $\log x$  e as médias comparadas pela aplicação do teste de Tukey, a 5% de probabilidade (BANZATTO; KRONKA, 2006).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Perda de massa dos grãos de milho

Na Tabela 2 estão apresentados os valores médios em termos de matéria seca, obtidos para massa final de grãos de milho híbridos armazenados em cinco períodos, sem e com a infestação de *S. zeamais*, assim como o coeficiente de variação e teste Tukey. A normalidade dos dados foi realizada pelo teste de aderência de Shapiro-Wilk, obtendo-se um p-valor = 0,02592, rejeitando a hipótese de normalidade, sendo assim realizou-se a transformação dos dados. Os coeficientes de variação para os fatores condição e período de armazenamento apresentaram baixa dispersão dos dados, o que era esperado, pois os grãos estavam em condições ambientes estáveis ao longo do armazenamento.

**Tabela 2** - Massa final de grãos de milho híbridos armazenados com e sem população inicial de insetos adultos de *S. zeamais*, em cinco períodos diferentes: 0, 45, 90, 135 e 180 dias

Massa final (g)	Período de armazenamento (dias)				
	0	45	90	135	180
Sem Inseto	261,00 a A	263,5 a A	264,13 a A	261,96 a A	265,48 a A
Com Inseto	261,00 a A	252,79 b A	235,67 b B	215,36 b C	219,28 b C

Notas: Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, com nível de significância de 0,05.

\* Os valores de massa final estão em base seca.

CV (condição) = 1,28%; CV (Período de armazenamento) = 1,18%.

Pode-se observar na Tabela 2 que as médias da massa final dos grãos sem insetos não apresentaram diferenças significativas, ao longo do período de armazenamento, não ocorrendo perdas desta massa em matéria seca. Porém, os grãos que se encontravam infestados apresentaram perdas de massa em matéria seca ao longo do tempo, sendo que os períodos 0 (inicial) e 45 dias se diferenciaram dos demais (90, 135 e 180 dias); o período de 90 dias se diferenciou dos demais (0, 45, 135 e 180 dias) e os períodos de 135 e 180 dias se diferenciaram dos períodos 0, 45 e 90 dias, apresentando a menor média de massa em matéria seca no período de 180 dias, justificando que o ataque de insetos em grãos, ao longo do tempo, ocasiona um aumento nas perdas de massa seca dos grãos e, conseqüentemente, um aumento nos defeitos. Para os períodos de armazenamento o tempo 0 (inicial) não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos, porém, para os períodos 45, 90, 135 e 180 dias os tratamentos se diferenciaram estatisticamente entre si, apresentando diferenças de matéria seca de 10,71; 28,46; 46,60; 46,2 gramas.

Antunes *et al.* (2011) encontraram resultados semelhantes para o tratamento de grãos infestados, estudando as características físico-químicas de grãos de milho atacados por *S. zeamais*. Durante o armazenamento, eles observaram que conforme aumentava o período de armazenamento aumentavam as perdas de massa, reduzindo significativamente a massa dos grãos.

Almeida Filho, Fontes e Arthur, (2002) avaliaram a redução de massa em diferentes cultivares de milho infestado por *S. zeamais* e *S. oryzae*, ao longo de 180 dias de armazenamento, e afirmaram que perdas de massa, causadas por insetos em grãos de milho, estão relacionadas com a preferência que estas pragas tem a certos tipos de cultivares, ocorrendo diferenças de infestação entre estas.

O nível de dano econômico, ocasionado por diferentes níveis de infestação por *S. zeamais* em trigo armazenado, foi estudado por Santos *et al.* (2002). Estes autores verificaram decréscimo da massa específica aparente do trigo, à medida que ocorriam maiores níveis de infestação pelo inseto-praga. Silva *et al.* (2003) verificaram efeito significativo da infestação por *S. zeamais* na massa específica aparente de grãos de trigo armazenado.

Alencar *et al.* (2011), ao estudarem a qualidade de milho armazenado e infestado por *S. zeamais* e *T. castaneum*, observaram um decréscimo significativo da massa específica aparente dos grãos de milho, independentemente da exposição ou não aos insetos-praga, ao longo do período de armazenamento. Verificando que o parâmetro índice de danos variou significativamente em decorrência da interação entre o período de armazenamento e a presença ou não de insetos na massa de grãos de milho e que tal comportamento foi mais acelerado nos grãos infestados, o que pode ser explicado pelo fato do inseto *S. zeamais* ser uma praga primária, sendo capaz de se alimentar de grãos sadios e intactos, rompendo o seu tegumento e, conseqüentemente, aumentando o índice de danos no produto.

## 5.2 Variação populacional de insetos

Na Tabela 3 estão apresentados os valores médios obtidos para sobrevivência, emergência, mortalidade e total de insetos em grãos de milho híbridos armazenados em cinco períodos, com infestação inicial de insetos adultos de *S. zeamais*, assim como o coeficiente de variação e teste Tukey. A normalidade dos dados foi realizada pelo teste de aderência de Shapiro-Wilk, obtendo-se os p-valores:  $p_1 = 0,0925$  para sobrevivência,  $p_2 = 0,0034$  para emergência,  $p_3 = 0,0066$  para mortalidade e  $p_4 = 0,0371$  para total de insetos, rejeitando a hipótese de normalidade para emergência, mortalidade e total de insetos, sendo assim realizou-se a transformação dos dados.

A evolução do aumento da sobrevivência, emergência, mortalidade e número total de insetos resultaram em coeficientes de variação de 37,38; 18,13; 21,78 e 16,54%, representando elevada e média dispersão dos dados, o que pode ser justificado considerando-se que, em cada tempo e repetição, os insetos agiam de forma diferente no seu desenvolvimento.

**Tabela 3** - População de insetos de grãos de milho híbridos armazenados com população inicial de insetos adultos de *S. zeamais*, em cinco períodos diferentes: 0,45, 90, 135 e 180 dias

População de insetos	Período de armazenamento (dias)				
	0	45	90	135	180
Sobrevivência (n°)	20 A	98 AB	242 C	222 BC	227 BC
Emergência (n°)	0 A	3 A	12 B	42 C	59 C
Mortalidade (n°)	0 A	6 A	259 B	404 BC	474 C
Total de insetos (n°)	20 A	107 A	513 B	668 B	760 B

Notas: Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey com nível de significância de 0,05.

CV (sobrevivência) = 37,38%; CV (emergência) = 18,13%; CV (mortalidade) = 21,78%; CV (total de insetos) = 16,54%.

Na Tabela 3, observa-se que as comparações das médias de sobrevivência apresentaram diferenças estatísticas durante o período de armazenamento; o período inicial tempo 0 diferiu estatisticamente dos períodos 90, 135 e 180 dias. O maior número de insetos vivos foi verificado no período de 90 dias de armazenamento, o qual diferiu estatisticamente dos tempos 0 e 45 dias.

Para a emergência de insetos os períodos de 135 e 180 dias apresentaram maior índice de emergência e diferiram dos períodos tempo 0, 45 e 90 dias; verificou-se que, conforme aumentava o período de armazenamento, aumentava também o número de emergência, sendo propício a um aumento na sobrevivência e na mortalidade dos insetos; para a mortalidade, o período inicial tempo 0 e 45 dias de armazenamento diferiram estatisticamente em relação aos tempos 90, 135 e 180 dias; o tempo de 180 dias apresentou maior número de insetos mortos e diferiu em relação aos tempos 0, 45 e 90 dias de armazenamento, observou-se que o aumento no tempo de armazenamento provoca uma aumento na população de insetos mortos.

Em relação ao número final de insetos *S. zeamais*, neste trabalho, os períodos de armazenamento tempo 0 e 45 dias diferiram estatisticamente em relação aos períodos de 90, 135 e 180 dias e, com o aumento do período de armazenamento, ocorreu um aumento na população total dos insetos, portanto as condições de temperatura em que se encontravam os grãos armazenados foram favoráveis ao aumento da população de insetos,

o que está de acordo com Santos (2008), que considera como ideal para o desenvolvimento do gorgulho temperaturas de 27 °C.

Antunes *et al.* (2011) observaram que conforme aumenta o tempo de armazenamento aumentam os valores de sobrevivência, emergência e mortalidade dos insetos *S. zeamais*. Alencar *et al.* (2011) também observaram que com o aumento do período de armazenamento houve um aumento no número de insetos vivos *S. zeamais* na massa de grãos de milho.

Silva *et al.* (2006), ao estudarem um modelo analítico de crescimento populacional de insetos *S. zeamais* em trigo armazenado com diferentes infestações e temperaturas, observaram que o crescimento populacional aumenta conforme a quantidade inicial de insetos que infestaram cada parcela, tendo como temperatura ideal 28 °C com drásticas diminuições abaixo e acima desta.

Alencar *et al.* (2011) destacam que a presença de insetos-praga no produto pode acarretar rejeição ou desvalorização do produto no mercado. Santos *et al.* (2002) afirmaram que a redução do valor comercial, tanto para o grão importado, quanto para o nacional, está diretamente relacionada com o número de insetos presentes na massa de grãos e, à medida que aumenta o número de insetos maior é a depreciação da matéria-prima durante o armazenamento, justificando redução da massa final de grãos e do peso hectolitro do grão, o que influenciará no rendimento de farinha durante a moagem.

### 5.3 Classificação do milho

Na Tabela 4 estão apresentados os valores médios obtidos para a porcentagem de grãos carunchados, chochos, quebrados, ardidos, fragmentados, fermentados, germinados, mofados e inteiros, além das impurezas em grãos de milho híbridos armazenados em cinco períodos, sem e com infestação inicial de insetos adultos de *S. zeamais*, assim como o coeficiente de variação e teste Tukey.

A normalidade dos dados foi realizada pelo teste de aderência de Shapiro-Wilk, obtendo-se os p-valores:  $p_1 = 0,0001205$  para grãos carunchados,  $p_2 = 0,2463$  para grãos chochos,  $p_3 = 0,03758$  para grãos quebrados,  $p_4 = 0,8401$  para grãos ardidos,  $p_5 = 0,002427$  para grãos fragmentados,  $p_6 = 0,00002877$  para grãos mofados,  $p_7 = 0,9014$  para impurezas e  $p_8 = 0,0009029$  para grãos inteiros, rejeitando a hipótese de normalidade para grãos carunchados, quebrados, fragmentados, mofados e inteiros, sendo assim, realizou-se a transformação dos dados.

A evolução do aumento dos grãos chochos e ardidos resultaram em coeficiente de variação de 47,29 e 26,38% para o fator condição e 34,27 e 30,57% para o fator período de armazenamento, representando uma elevada dispersão dos dados, assim como para a

percentagem de impurezas com coeficiente de variação de 44,27% para condição e 29,7% para período de armazenamento. Os grãos carunchados apresentaram coeficientes de variação de 13,87 e 14,98% para os fatores condição e período de armazenamento, representando uma média dispersão dos dados e a porcentagem de grãos quebrados, fragmentados, mofados e inteiros apresentou baixa dispersão dos dados, tendo como coeficiente de variação para o fator condição valores de 8,07; 4,37; 6,15 e 4,37% e para o fator período de armazenamento valores de 6,28; 5,53; 6,47 e 4,11%.

**Tabela 4** - Classificação de grãos de milho híbridos armazenados sem e com população inicial de insetos adultos de *S. zeamais*, em cinco períodos diferentes: 0, 45, 90, 135 e 180 dias

Tipo de dano do grão (%)	Tratamento	Período de armazenamento (dias)				
		0	45	90	135	180
Carunchado	Sem inseto	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A
	Com inseto	0,00 a A	5,20 b B	40,22 b C	49,67 b CD	54,76 b D
		CV (condição) = 13,87% CV (período de armazenamento) = 14,98%				
Chocho	Sem inseto	0,21 a A	0,24 a A	0,23 a A	0,53 a A	0,45 a A
	Com inseto	0,32 a A	0,49 b AB	0,50 b AB	0,70 a B	0,71 b B
		CV (condição) = 47,29% CV (período de armazenamento) = 34,27%				
Quebrado	Sem inseto	4,29 a A	3,83 a A	4,35 a A	4,38 a A	4,62a A
	Com inseto	4,23 a A	5,34 a A	4,96 a A	4,76 a A	4,35 a A
		CV (condição) = 8,07% CV (período de armazenamento) = 6,28%				
Ardido	Sem inseto	1,32 a A	1,47 a A	1,53 a A	1,54 a A	1,73 b A
	Com inseto	0,92 a A	1,05 a A	1,18 a A	1,51 a A	1,05 a A
		CV (condição) = 26,38% CV (período de armazenamento) = 30,57%				
Fragmentado	Sem inseto	0,03 a A	0,09 a AB	0,13 a B	0,15 a B	0,22 a B
	Com inseto	0,14 b A	0,25 b AB	0,26 b AB	0,28 b AB	0,35 b B
		CV (condição) = 4,37% CV (período de armazenamento) = 5,53%				
Fermentado	Sem inseto	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA
	Com inseto	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA
		CV (condição) = 0% CV (período de armazenamento) = 0%				
Germinado	Sem inseto	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A
	Com inseto	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A
		CV (condição) = 0% CV (período de armazenamento) = 0%				
Mofado	Sem inseto	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A
	Com inseto	0,07 a A	0,66 b B	1,99 b C	1,65 b C	0,99 b D
		CV (condição) = 6,15% CV (período de armazenamento) = 6,47%				
Impurezas	Sem inseto	0,08 a AB	0,10 a AB	0,04 a B	0,16 a A	0,15 a A
	Com inseto	0,22 b A	0,22 b A	0,23 b A	0,19 a A	0,07 b B
		CV (condição) = 44,27% CV (período de armazenamento) = 29,7%				
Inteiro	Sem inseto	94,25 a A	94,25 a A	93,63 a A	93,18 a A	92,81 a A
	Com inseto	94,10 a A	86,78 a A	50,79 b B	41,57 b C	37,26 b C
		CV (condição) = 4,37% CV (período de armazenamento) = 4,11%				

Nota: Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey com nível de significância de 0,05.

Os resultados apresentados na Tabela 4 de classificação de grãos sem e com infestação por *S. zeamais* variaram entre os cinco períodos de armazenamento avaliados.

Para a porcentagem de grãos carunchados os períodos de armazenamento tempo 0 (inicial) não apresentou diferenças entre os tratamentos, porém para os períodos 45, 90, 135 e 180 dias os tratamentos diferenciaram estatisticamente entre si. O tratamento sem inseto não diferenciou ao longo do período de armazenamento, já o tratamento com insetos apresentou diferenças, sendo que: o tempo 0 diferenciou dos demais períodos, assim como o período de 45 dias; o período de 90 dias diferenciou dos períodos 0, 45 e 180 dias; o período de 135 dias diferenciou dos períodos 0 e 45 dias; o período de 180 dias, que apresentou a maior porcentagem de grãos carunchados, diferenciou dos períodos 0, 45 e 90 dias de armazenamento. Observa-se que, ao longo do tempo, a porcentagem de grãos carunchados no tratamento com insetos aumenta, fato explicado em virtude dos períodos apresentarem maior número na população de insetos *S. zeamais*, ocorrendo a emergência dos insetos ao longo dos períodos de armazenamento.

Para a porcentagem de grãos chochos os períodos de armazenamento tempo 0 (inicial) e 135 dias não apresentaram diferenças entre os tratamentos, porém, para os períodos 45, 90 e 180 dias os tratamentos diferenciaram estatisticamente entre si. O tratamento sem inseto não diferenciou ao longo do período de armazenamento, já o tratamento com insetos apresentou diferenças, em que o tempo 0 diferenciou dos tempos 135 e 180 dias. No tratamento com insetos, observa-se que a porcentagem de grãos chochos aumentou ao longo do período de armazenamento, o que pode estar relacionado ao tempo de exposição dos grãos na temperatura de armazenamento.

Para a porcentagem de grãos ardidos os períodos de armazenamento tempo 0 (inicial), 45, 90 e 135 dias não apresentaram diferenças entre os tratamentos, apenas o período de 180 dias apresentou diferenças entre os tratamentos. O tratamento sem insetos apresentou maior porcentagem de grãos ardidos. Os tratamentos com e sem insetos não diferenciaram estatisticamente ao longo do período de armazenamento.

Para a porcentagem de grãos fragmentados, os períodos de armazenamento não apresentaram diferenças entre os tratamentos. O tratamento sem e com insetos apresentou diferenças durante os períodos de armazenamento, sendo que o período de 0 dias diferenciou dos períodos de 90, 135 e 180 dias para o tratamento sem inseto e o período de 0 dias diferenciou do período de 180 dias para o tratamento com inseto. Ambos os tratamentos aumentaram a porcentagem de grãos fragmentados com o tempo, ou seja, quanto mais tempo os grãos ficam expostos aos insetos e a temperaturas de 27 °C mais rachaduras ocorrem nas estruturas dos grãos.

Para a porcentagem de grãos mofados os períodos de armazenamento tempo 0 (inicial) não apresentou diferenças entre os tratamentos, porém, para os períodos 45, 90, 135 e 180 dias os tratamentos diferenciaram estatisticamente entre si. O tratamento sem

inseto não diferenciou ao longo do período de armazenamento, já o tratamento com insetos apresentou diferenças, sendo que o tempo 0 diferenciou dos demais períodos, assim como o período de 45 dias, os períodos de 90 e 135 dias não diferenciaram entre si, diferenciando apenas dos demais (0, 45 e 180 dias) e o período de 180 dias diferenciou dos demais períodos. O tempo de 90 dias no tratamento com insetos apresentou a maior percentagem de grãos mofados, o que pode estar relacionado aos insetos, pois, neste período ocorreu o maior número de insetos *S. zeamais* vivos, conforme Tabela 3.

A percentagem de impurezas para o período de armazenamento tempo 135 dias não apresentou diferenças entre os tratamentos, porém para os períodos 0, 45, 90 e 180 dias os tratamentos diferenciaram estatisticamente entre si. O tratamento sem insetos apresentou diferenças entre os períodos de 135 e 180 dias com o período de 90 dias; o tratamento com insetos apresentou diferenças entre o período de 180 dias com os demais, no entanto, estes resultados estão relacionados à seleção dos grãos para cada repetição e para cada tempo, a qual foi realizada de forma aleatória.

Para a percentagem de grãos inteiros os períodos de armazenamento tempo 0 e 45 dias não apresentaram diferenças entre os tratamentos, porém para os períodos 90, 135 e 180 dias os tratamentos diferenciaram estatisticamente entre si. O tratamento sem inseto não diferenciou ao longo do período de armazenamento, já o tratamento com insetos apresentou diferenças, sendo que o tempo 0 e 45 dias diferenciaram dos demais períodos, assim como o período de 90 dias diferenciou dos períodos de 0,45, 135 e 180 dias; os períodos de 135 e 180 dias diferenciaram dos demais períodos também, apresentando as menores percentagens de grãos inteiros. Observa-se que no tratamento com insetos o aumento de grãos carunchados leva a uma redução dos grãos inteiros, o que era esperado. Os demais resultados percentagem de grãos quebrados, fermentados e germinados não apresentaram diferenças estatísticas tanto para os tratamentos como para os períodos de armazenamento.

Ao se realizar a classificação desses lotes, concluiu-se que, para o tratamento sem insetos, devido à percentagem de grãos quebrados, estes estariam classificados como Tipo III para os períodos de 0, 90, 135 e 180 dias; para o período de 45 dias estariam classificados como Tipo II para comercialização; para o tratamento com insetos os grãos estão classificados como Tipo III para o período 0 dias por apresentarem percentagem de grãos quebrados maior que 4%; a partir dos 45 dias, os grãos estariam abaixo do nível padrão para comercialização (Fora de tipo), por sua percentagem de grãos carunchados estar maior que 4%, acarretando prejuízos para o produtor (BRASIL, 2009b).

Ferrari Filho (2011), estudando os métodos e temperaturas de secagem sobre a qualidade físico-química e microbiológica de grãos de milho no armazenamento, observou que, até os seis meses de armazenamento, mantiveram-se os resultados dos grãos inteiros em relação ao tempo 0, não apresentando diferenças significativas em grãos em condições

sem insetos, não estando de acordo com os dados obtidos no presente trabalho, os quais apresentaram diferenças estatísticas.

Antunes *et al.* (2011) encontraram resultados semelhantes em grãos com insetos, em que o número de grãos inteiros diminuiu ao longo do armazenamento e que, a partir dos 120 dias de armazenamento, os grãos estavam classificados abaixo do nível padrão para a comercialização, afirmando que o ataque de insetos leva à desvalorização comercial do produto.

De acordo com levantamento feito por amostragem em milho armazenado em espigas, em Minas Gerais, Santos *et al.* (1983) verificaram que, entre a colheita realizada em maio/junho e os meses de agosto, novembro e março do ano seguinte, o índice de danos (grãos carunchados) causados pelos insetos ao milho estocado em paiol atingiu 17,3, 36,4 e 44,5%, respectivamente, dados semelhantes aos obtidos neste trabalho, a partir dos 90 dias de armazenamento.

Alencar *et al.* (2011) observaram que o teor de impurezas e de matéria estranha na massa de grãos de milho apresentou aumento significativo em todos os tratamentos ao longo do período de armazenamento e que os tratamentos que se encontravam infestados esse comportamento foi mais acentuado do que o tratamento que não estava infestado, o mesmo pode ser observado neste trabalho.

#### **5.4 Massa de 1000 grãos**

Na Tabela 5 estão apresentados os valores médios obtidos para a massa de 1000 grãos de milho híbridos, armazenados em cinco períodos, sem e com infestação inicial de insetos adultos de *S. zeamais*, assim como o coeficiente de variação e teste Tukey. A normalidade dos dados foi realizada pelo teste de aderência de Shapiro-Wilk, obtendo-se p-valor = 0.02686, rejeitando a hipótese de normalidade para a massa de 1000 grãos, sendo assim realizou-se a transformação dos dados.

As médias dos tratamentos com e sem insetos para a massa de 1000 grãos resultaram em um coeficiente de variação de 1,31% para o fator condição e 3,11% para o fator período de armazenamento, apresentando baixa dispersão dos dados.

**Tabela 5** - Massa de 1000 grãos de milho híbridos armazenados sem e com população inicial de insetos adultos de *S. zeamais*, em cinco períodos diferentes: 0, 45, 90, 135 e 180 dias

Massa de 1000 grãos	Período de armazenamento (dias)				
	0	45	90	135	180
Sem inseto (g)	275,49 a A	285,14 a A	308,88 a A	298,95 a A	285,50 a A
Com inseto (g)	283,96 a A	275,71 a AB	279,81 b A	262,38 b AB	244,94 b B

Notas: Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey com nível de significância de 0,05.

\* Os valores de massa de 1000 grãos estão em base seca.

CV (condição) = 1,31%; CV (Período de armazenamento) = 3,11%.

Pode-se observar na Tabela 5 que as médias da massa de 1000 grãos sem insetos não apresentaram diferenças significativas, ao longo do período de armazenamento, não ocorrendo perdas desta massa. Porém, os grãos que se encontravam infestados apresentaram perdas de massa de 1000 grãos, ao longo do tempo, sendo que os períodos 0 (inicial), 45 e 90 dias diferenciaram do período de 180 dias, apresentando a menor média de massa, confirmando que o inseto-praga provoca danos na massa de grãos, consumindo reservas e provocando maiores perdas quantitativas, pois no período de 180 dias de armazenamento foi verificado o maior número populacional de insetos totais e a maior perda de massa de 1000 grãos. Para os períodos de armazenamento os tempos 0 e 45 dias não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos, porém, para os períodos 90, 135 e 180 dias os tratamentos diferenciaram estatisticamente entre si.

Ferrari Filho (2011) observou que as maiores perdas na massa de 1000 grãos ocorreram após seis meses de armazenamento, período em que a temperatura e a umidade de armazenamento foram maiores, levando a um aumento no ataque de insetos e organismos associados e no metabolismo de grãos, consumindo reservas e, por consequência, maior perda quantitativa.

Segundo Puzzi (2000), as menores perdas de massa de 1000 grãos estão relacionadas aos melhores parâmetros conservativos da massa de grãos durante o armazenamento.

## 5.5 Teor de água

Na Tabela 6 estão apresentados os valores médios obtidos para o teor de água em grãos de milho híbridos armazenados em cinco períodos, sem e com infestação inicial de insetos adultos de *S. zeamais*, assim como o coeficiente de variação e teste Tukey. A normalidade dos dados foi realizada pelo teste de aderência de Shapiro-Wilk, obtendo-se

p-valor = 0.00249, rejeitando a hipótese de normalidade para o teor de água dos grãos, sendo assim realizou-se a transformação dos dados.

As médias dos tratamentos com e sem insetos para o teor de água nos grãos, resultaram em um coeficiente de variação de 2,29% para o fator condição e 2,79% para o fator período de armazenamento, apresentando baixa dispersão dos dados, o que era esperado, pois os grãos estavam em temperatura controlada de 27 °C, ao longo do armazenamento.

**Tabela 6** - Teor de água em grãos de milho híbridos armazenados sem e com população inicial de insetos adultos de *S. zeamais*, em cinco períodos diferentes: 0, 45, 90, 135 e 180 dias

Teor de Água (b.s)	Período de armazenamento (dias)				
	0	45	90	135	180
Sem inseto (%)	14,93 a A	11,53 a B	10,63 a BC	9,06 a D	9,61 a CD
Com inseto (%)	14,84 a A	12,40 a B	13,98 b A	9,80 a C	10,30 a C

Notas: Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey com nível de significância de 0,05.

\* Os valores de teor de água dos grãos estão em base seca.

CV (condição) = 2,29 %; CV (Período de armazenamento) = 2,79%.

Pode-se observar na Tabela 6 que as médias do teor de água em grãos sem insetos apresentaram diferenças significativas ao longo do período de armazenamento. O período 0 diferenciou dos demais, o período 45 dias diferenciou dos períodos 0, 135 e 180 dias, o período de 90 dias diferenciou dos períodos 0 e 135 dias, o período de 135 diferenciou dos períodos 0, 45 e 90 dias, ocorrendo uma redução deste teor ao longo do tempo de armazenamento. Para os grãos com insetos, os períodos 0 e 90 dias diferenciaram dos demais, o período de 45 dias diferenciou-se dos períodos 0, 90, 135 e 180 dias, e os períodos 135 e 180 dias diferenciaram dos períodos 0, 45 e 90 dias. Para os períodos de armazenamento os tempos 0, 45, 135 e 180 dias não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos, porém para o período de 90 dias os tratamentos diferenciaram estatisticamente entre si e o tratamento com insetos apresentou maior teor de água em base seca.

A partir do tempo 0 os grãos infestados apresentaram maiores valores do teor de água, em relação aos grãos que não estavam infestados. Isso se deve ao metabolismo dos insetos, ou seja, a sua respiração e à respiração dos grãos, pois o processo respiratório nos grãos armazenados é acelerado pela própria reação, a qual aumenta o teor de umidade e a temperatura do produto. O aumento da umidade dos grãos tem origem na presença da água metabólica, resultante das transformações químicas da respiração.

Esses resultados estão de acordo com Pinto *et al.* (2002), que analisaram a influência da densidade populacional de *S. zeamais* (Motsch.) sobre a qualidade do trigo

destinado à panificação, os quais também observaram um aumento do teor de umidade, devido ao metabolismo dos insetos, ou seja, devido à sua respiração, havendo acréscimo no teor de umidade da massa de grãos de trigo em todos os tratamentos. Os frascos nos quais havia maior densidade de insetos, esse aumento foi mais pronunciado, resultando, assim, em perda da qualidade do produto, bem como um aumento da deterioração.

Silva *et al.* (2003), que analisaram as perdas causadas por *S. zeamais* e *R. Dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae) em trigo armazenado, também observaram que a umidade dos grãos aumentou à medida que aumentou a população de ambos os insetos presentes no armazenamento. Porém, estes resultados contradizem os encontrados por Antunes *et al.* (2011), em que a umidade dos grãos infestados não diferiu estatisticamente, ao longo do tempo de armazenamento.

Os teores de água em grãos sem insetos estão de acordo com os encontrados por Faroni *et al.* (2005), que observaram um decréscimo no teor de água dos grãos de milho, ao longo do período de armazenamento, para as temperaturas acima de 25 °C.

## 5.6 Teor de cinzas

Na Tabela 7 estão apresentados os valores médios obtidos para o teor de cinzas em grãos de milho híbridos armazenados em cinco períodos, sem e com infestação inicial de insetos adultos de *S. zeamais*, assim como o coeficiente de variação e teste Tukey. A normalidade dos dados foi realizada pelo teste de aderência de Shapiro-Wilk, obtendo-se p-valor = 0.1834, aceitando a hipótese de normalidade.

As médias dos tratamentos com e sem insetos, para o teor de cinzas dos grãos, resultaram em um coeficiente de variação de 23,77% para o fator condição e 21,97% para o fator período de armazenamento, apresentando alta dispersão dos dados.

**Tabela 7** - Teor de cinzas em grãos de milho híbridos armazenados sem e com população inicial de insetos adultos de *S. zeamais*, em cinco períodos diferentes: 0, 45, 90, 135 e 180 dias

Teor de cinzas	Período de armazenamento (dias)				
	0	45	90	135	180
Sem inseto (%)	1,19 a A	1,27 a A	1,17 a A	1,70 a A	1,21 a A
Com inseto (%)	1,16 a AB	0,77 b A	1,06 a AB	1,51 a B	1,22 a AB

Notas: Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey com nível de significância de 0,05.

\* Os valores de teor de cinzas dos grãos estão em base seca.

CV (condição) = 23,77%; CV (Período de armazenamento) = 21,97%.

Pode-se observar na Tabela 7 que as médias do teor de cinzas em grãos sem insetos não apresentaram diferenças significativas, ao longo do período de armazenamento; para os grãos com insetos, o período de 45 dias diferenciou do período de 135 dias, o qual apresentou maior teor de cinzas nos grãos com insetos. Para os períodos de armazenamento o tempo 0, 90, 135 e 180 dias não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos, porém para o período de 45 dias os tratamentos diferenciaram estatisticamente entre si, e o tratamento sem insetos apresentou maior teor de cinzas.

Jood e Kapoor (1992) observaram que, quando os grãos se encontravam infestados com *R. dominica* ocorria um aumento significativo no teor de cinzas em grãos de trigo e sorgo, durante o tempo de armazenamento, devido à perda do conteúdo do endosperma causado pelos insetos. Porém, estes resultados não estão de acordo com os encontrados no presente trabalho, pois os grãos sem insetos obtiveram as maiores médias de teor de cinzas.

Esses resultados contradizem também os obtidos por Freo (2010) que, no estudo sobre a aplicação de terra diatomácea e infestação com *Rhyzopertha dominica*, nas propriedades físico-químicas e tecnológicas de grãos de trigo armazenados no sistema convencional, o teor de cinzas não foi significativo para a infestação com *R. dominica* e interação tempo x insetos, porém observou que, com o passar do tempo, ocorreu redução no teor de cinzas em todos os tratamentos estudados. As variações no conteúdo mineral estão relacionadas à distribuição dos componentes dos grãos e do modo de alimentação dos insetos.

## 5.7 Teor de óleo

Na Tabela 8 estão apresentados os valores médios obtidos para o teor de óleo em grãos de milho híbridos armazenados em cinco períodos, sem e com infestação inicial de insetos adultos de *S. zeamais*, assim como o coeficiente de variação e teste Tukey. A normalidade dos dados foi realizada pelo teste de aderência de Shapiro-Wilk, obtendo-se p-valor = 0.1091, aceitando a hipótese de normalidade para teor de óleo.

As médias dos tratamentos com e sem insetos para o teor de óleo dos grãos resultaram em um coeficiente de variação de 14,36% para o fator condição e 19,87% para o fator período de armazenamento, apresentando baixa dispersão dos dados.

**Tabela 8** - Teor de óleo em grãos de milho híbridos armazenados sem e com população inicial de insetos adultos de *S. zeamais*, em cinco períodos diferentes: 0, 45, 90, 135 e 180 dias

Teor de óleo	Período de armazenamento (dias)				
	0	45	90	135	180
Sem inseto (%)	2,94 a A	2,39 a A	2,65 a A	2,64 a A	2.40 a A
Com inseto (%)	2,99 a A	2,42 a A	2,76 a A	2,90 a A	2.53 a A

Notas: Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey com nível de significância de 0,05.

\* Os valores de teor de óleo dos grãos estão em base seca.

CV (condição) = 14,36%; CV (Período de armazenamento) = 19,87%.

Pode-se observar na Tabela 8 que as médias do teor de cinzas em grãos sem e com insetos não apresentaram diferenças significativas ao longo do período de armazenamento, e que, para os períodos de armazenamentos, os tratamentos também não diferenciaram estatisticamente, porém, o tratamento sem inseto apresentou menores valores do teor de óleo do que os com insetos.

Antunes *et al.* (2011) observaram que as médias do teor de lipídeos em grãos infestados diminuíram conforme aumentava o número de insetos ao longo do armazenamento. Freo (2010) também observou diferenças estatísticas para os teores de lipídios, durante o período de armazenamento, em função da infestação com *R. dominica*, não estando de acordo com as médias encontradas no presente trabalho, nas quais o teor de lipídeos não reduziu ao longo do tempo nos grãos com insetos.

Segundo Matioli e Almeida (1979), os insetos atacam primeiro o endosperma do grão de milho, porém os insetos consomem mais o germe, causando uma diminuição maior no teor de óleo, podendo a proteína até aumentar, por duas razões: primeiro, por proporção normal devido ao consumo maior de gordura e menor de proteína; segundo, porque na amostra pode ser determinada, juntamente com a proteína dos grãos, a proteína dos insetos e, com isto, pode também aumentar a porcentagem, no presente trabalho essa porcentagem de teor de óleo não reduziu significativamente ao ponto de provocar um aumento no teor de proteína, devido a esse fator.

Os resultados são satisfatórios para a fabricação de ração, não apresentando valores baixos no teor de óleo, pois, segundo Antunes *et al.* (2011), uma diminuição da gordura nos grãos de milho acarreta problemas para a fabricação de rações, pois a gordura é um dos constituintes mensurados na elaboração da dieta voltada para o ganho de peso de animais de corte comercial. Ao comercializar este lote ou fabricar a própria ração, o produtor não terá os ganhos esperados podendo arcar, até mesmo, com prejuízos aos custos de fabricação/implementação da lavoura.

## 5.8 Teor de proteína

Na Tabela 9 estão apresentados os valores médios obtidos para o teor de proteína em grãos de milho híbridos armazenados em cinco períodos, sem e com infestação inicial de insetos adultos de *S. zeamais*, assim como o coeficiente de variação e teste Tukey. A normalidade dos dados foi realizada pelo teste de aderência de Shapiro-Wilk, obtendo-se p-valor = 0.6035, aceitando a hipótese de normalidade.

As médias dos tratamentos com e sem insetos para o teor de proteína dos grãos resultaram em um coeficiente de variação de 9,81% para o fator condição e 7,83% para o fator período de armazenamento, apresentando baixa dispersão dos dados.

**Tabela 9** - Teor de proteína em grãos de milho híbridos armazenados sem e com população inicial de insetos adultos de *S. zeamais*, em cinco períodos diferentes: 0, 45, 90, 135 e 180 dias

Teor de proteína	Período de armazenamento (dias)				
	0	45	90	135	180
Sem inseto (%)	8,05 a A	9,21 a A	8,61 a A	9,29 a A	8,93 a A
Com inseto (%)	7,85 a A	8,91 a AB	9,4 a BC	9,97 a BC	10,45 b C

Notas: Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey com nível de significância de 0,05.

\* Os valores de teor de proteína dos grãos estão em base seca.

CV (condição) = 9,81%; CV (Período de armazenamento) = 7,83%.

Pode-se observar na Tabela 9 que as médias do teor de proteína em grãos sem insetos não apresentaram diferenças significativas, ao longo do período de armazenamento; para os grãos com insetos o período de 0 dias diferenciou dos períodos de 90, 135 e 180 dias; o período de 45 dias diferenciou apenas do período de 180 dias, o qual apresentou maior porcentagem de proteína nos grãos, diferenciando este dos períodos 0 e 45 dias. Para os períodos de armazenamento o tempo 0, 45, 90 e 135 dias não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos, porém apenas no período de 180 dias os tratamentos diferenciaram estatisticamente entre si.

O tratamento com insetos apresentou maior teor de proteínas a partir do período de 45 dias, em relação ao tratamento sem insetos, aumento que pode ter ocorrido devido à alimentação dos insetos, reduzindo o teor de carboidratos.

Estes resultados estão de acordo com Pinto *et al.* (2002), que observaram que, quanto maior o número de insetos de *S. zeamais* e o período de armazenagem, maior foi o teor de proteínas totais, e que na ausência do inseto não ocorreu variação no conteúdo protéico. Afirmando que o acréscimo no teor de proteínas totais devido à infestação com

*S. zeamais* pode ser explicado pela proteólise e também pela alimentação dos insetos, que reduz o conteúdo de carboidratos, ocasionando aumento percentual do conteúdo protéico.

Freo (2010) também observou resultados semelhantes, nos quais quanto maior era a densidade de *Rhyzopertha dominica* nos grãos de trigo durante o armazenamento, maior o acréscimo no teor de proteínas. Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com Aja, Peres e Rossel (2004) e Seok-Ho Park *et al.* (2008), os quais, também, verificaram aumento no teor de proteínas com o período de armazenamento e infestação de insetos.

Estes resultados contradizem os de Ferrari Filho (2011), que constatou que aos seis meses de estocagem, quando constatada a presença de insetos da espécie *Sitophilus zeamais*, ocorreu uma redução nos teores de proteína bruta e extrato etéreo dos grãos, devido à presença desses insetos que atacaram diretamente o embrião do grão e consumiram estes nutrientes.

## 5.9 Teor de carboidratos e fibra alimentar total

Na Tabela 10 estão apresentados os valores médios obtidos para o teor de carboidratos e fibra alimentar total em grãos de milho híbridos armazenados em cinco períodos, sem e com infestação inicial de insetos adultos de *S. zeamais*, assim como o coeficiente de variação e teste Tukey. A normalidade dos dados foi realizada pelo teste de aderência de Shapiro-Wilk, obtendo-se  $p$ -valor = 0.1399, aceitando a hipótese de normalidade.

As médias dos tratamentos com e sem insetos para o teor de carboidratos e fibra alimentar total dos grãos resultaram em um coeficiente de variação de 1,29% para o fator condição e 1,51% para o fator período de armazenamento, apresentando baixa dispersão dos dados.

**Tabela 10** - Teor de carboidratos e fibra alimentar total em grãos de milho híbridos armazenados sem e com população inicial de insetos adultos de *S. zeamais*, em cinco períodos diferentes: 0, 45, 90, 135 e 180 dias

Teor de carboidratos e fibra alimentar	Período de armazenamento (dias)				
	0	45	90	135	180
Sem inseto (%)	73,30 a A	75,03 a AB	77,19 a BC	77,05 a BC	77,83 a C
Com inseto (%)	73,75 a AB	74,91 a AB	73,13 b B	76,07 a A	75,49 b AB

Notas: Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey com nível de significância de 0,05.

\* Os valores de teor de carboidratos e fibra alimentar total dos grãos estão em base seca.

CV (condição) = 1,29%; CV (Período de armazenamento) = 1,51%.

Pode-se observar na Tabela 10 que as médias do teor de proteína em grãos sem insetos apresentaram diferenças ao longo do período de armazenamento. O período 0 dias diferenciou dos períodos 90, 135 e 180 dias; o período de 180 dias diferenciou dos períodos 0 e 45 dias, apresentando maior porcentagem no teor de carboidratos e fibra alimentar em relação aos demais períodos; para os grãos com insetos o período de 0 dias diferenciou do período de 135 dias. Para os períodos de armazenamento o tempo 0, 45 e 135 dias não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos, apenas os períodos 90 e 180 dias diferenciaram estatisticamente entre si os tratamentos.

A condição de grãos com inseto apresentou um menor índice no teor de carboidrato e fibra alimentar total em relação aos grãos que não se encontravam infestados, mostrando que os insetos provocam perdas deste teor nos grãos, o que pode estar relacionado também a um aumento virtual. Segundo Ferrari Filho (2011), o aumento no teor de carboidratos ao longo do tempo pode ser um aumento virtual, aparente ou relativo, uma vez que decorre da diminuição das frações proteína e extrato etéreo durante o armazenamento.

Essa variação em incrementos aparentes da fração carboidratos reflete uma relação proporcional, em consequência do requerimento de constituintes dessa fração no metabolismo intrínseco dos grãos, de microrganismos e pragas associados, além do fato de serem estes constituintes bastante suscetíveis a transformações químicas, enzimáticas e não enzimáticas, durante o armazenamento (ELIAS, 2008).

#### **5.10 Fungos filamentosos e identificação dos fungos produtores de aflatoxinas**

Os fungos filamentosos foram identificados pela técnica de microcultivo, sendo identificados como *Aspergillus* sp, conforme as figuras 3 e 4.



**Figura 3** - Placa de Agar Dextrose Batata com colônias de *Aspergillus* sp, após 5 dias de incubação.



**Figura 4** - Imagem microscópica de hifas de *Aspergillus* sp.

Fonte: Costa e Zanella (2012).

Na Tabela 11 estão apresentados os valores médios obtidos para o número de UFC/g (unidade formadora de colônias por grama) de fungos filamentosos em grãos de milho híbridos armazenados em cinco períodos, sem e com infestação inicial de insetos adultos de *S. zeamais*, assim como o coeficiente de variação e teste Tukey. A normalidade dos dados foi realizada pelo teste de aderência de Shapiro-Wilk, obtendo-se  $p\text{-valor} = 0,0000001554$ , rejeitando a hipótese de normalidade para o número de UFC/g, sendo assim realizou-se a transformação dos dados.

As médias dos tratamentos com e sem insetos para o número de unidade formadora de colônias por grama dos grãos resultaram em um coeficiente de variação de 7,43% para o fator condição e 10,37% para o fator período de armazenamento, apresentando baixa e média dispersão dos dados.

**Tabela 11** - Número de UFC/g (unidade formadora de colônias por grama) de fungos filamentosos em grãos de milho híbridos armazenados sem e com população inicial de insetos adultos de *S. zeamais*, em cinco períodos diferentes: 0, 45, 90, 135 e 180 dias

UFC/g	Período de armazenamento (dias)				
	0	45	90	135	180
Sem inseto ( $10^3$ )	3,6 a A	3,5 a A	1,5 a A	1,7 a A	6,8 a A
Com inseto ( $10^3$ )	3,4 a A	4,1 a A	33,7 b B	10 a A	0 a A

Notas: Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey com nível de significância de 0,05.

CV (condição) = 7,43%; CV (Período de armazenamento) = 10,37%.

Pode-se observar na Tabela 11 que as médias do número de unidade formadora de colônias por grama em grãos sem insetos não apresentaram diferenças ao longo do período de armazenamento; para os grãos com insetos o período de 90 dias diferenciou dos demais, apresentando maior número de UFC/g no tratamento. Para os períodos de armazenamento os tempos 0, 45, 135 e 180 dias não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos, apenas os períodos 90 dias diferenciaram estatisticamente entre si os tratamentos.

Observa-se que os grãos que estavam em condições com insetos, ocorreu um aumento no número de fungos filamentosos até os 90 dias de armazenamento e, após este período, ocorreu uma redução, em que o período de 90 dias obteve o maior número de UFC/g. Essa redução dos fungos filamentosos nos grãos pode ter ocorrido pelo fato dos insetos terem se alimentado das partes dos fungos filamentosos a partir dos 90 dias evitando a proliferação destes. Segundo Lorini (2002), alguns insetos são capazes de se alimentarem de fungos e que, após o consumo dos fungos, os besouros se alimentam dos germes dos grãos.

O tratamento sem inseto apresentou um aumento no tempo de 180 dias de armazenamento, em que a temperatura de armazenamento de 27 °C foi propícia ao desenvolvimento do fungo *Aspergillus* ssp., visto que a velocidade de crescimento desses microrganismos nos grãos se desenvolve em temperaturas entre 10 e 35 °C, conforme Dhingra e Coelho Netto, (1998) .

Ferrari Filho (2011) observou uma tendência à elevação da ocorrência de fungos do gênero *Aspergillus* ao longo do tempo de armazenamento. Costa e Zanella (2012), na identificação de fungos filamentosos em derivados de milho comercializados em Primavera

do Leste – MT, observaram que os fungos do gênero *Aspergillus* spp. se desenvolveram durante o armazenamento dos produtos derivados do milho e que a contaminação pode ter ocorrido devido às condições favoráveis de crescimento aos fungos, como o alto teor de umidade, a temperatura pouco elevada dos locais de armazenamento dos grãos ou dos produtos já processados.

Aquino e Potenza (2013), ao analisarem a microbiota associada à entomofauna em rações a granel para animais domésticos, observaram que os fungos associados ao inseto *Sitophilus zeamais* foram *Fusarium* spp., leveduras, FNE, *Aspergillus terreus* e *Penicillium* spp., sendo os gêneros associados às micotoxinas o *Fusarium* e *Penicillium*.

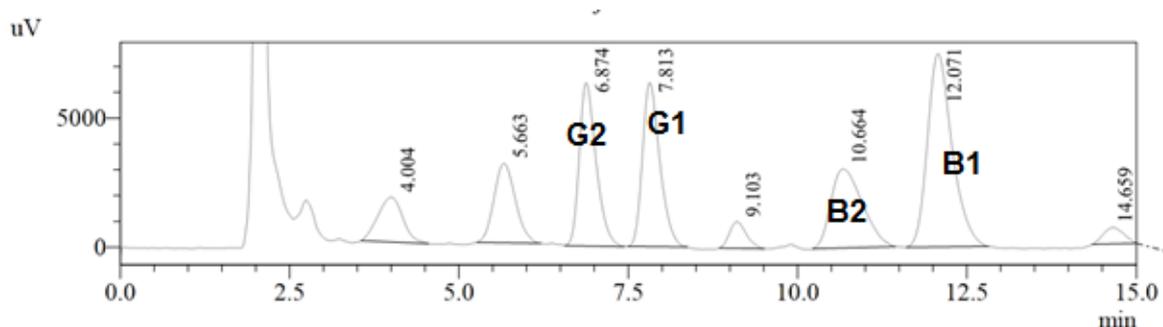
### 5.11 Quantificação de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2)

A linearidade do método das curvas de calibração foi comprovada pelos coeficientes de correlação linear ( $R^2$ ), que foram obtidos através da análise de regressão linear pelo método do mínimo quadrado das curvas de calibração. Os coeficientes obtidos para as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 foram 0,9951, 0,9986, 0,9941 e 0,9975, respectivamente.

Os limites de detecção para as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 foram, respectivamente,  $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $0,05 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  e  $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  e a determinação dos níveis de recuperação foi realizada com amostras contaminadas artificialmente com  $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  para as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.

As taxas médias de recuperação obtidas para as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 demonstraram os seguintes percentuais 68%, 93%, 71% e 68%, respectivamente. Conforme o Regulamento da União Europeia: RCE n.º 401, de 23 de fevereiro de 2006, os critérios de desempenho para recuperação de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, para uma gama de concentração de  $1-10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , recomendam valores de 70 a 110% (UNIÃO EUROPEIA, 2014); os valores de B2 e G2 se encontram dentro dos níveis aceitáveis de recuperação.

Na Figura 5 visualiza-se o cromatograma das recuperações das aflatoxinas. Os tempos de retenção obtidos foram 12,07, 10,66, 7,81 e 6,87 para as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, respectivamente.



**Figura 5** - Cromatograma de recuperação das aflatoxinas AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2.

Na Tabela 12 estão apresentados os níveis de incidência de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) em grãos de milho híbridos armazenados em cinco períodos, em condições de com e sem infestação inicial de insetos adultos de *S. zeamais*.

**Tabela 12** - Níveis de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) em grãos de milho híbridos armazenados sem e com população inicial de insetos adultos de *S. zeamais*, em cinco períodos diferentes: 0, 45, 90, 135 e 180 dias

Condição	Período de armazenamento (dias)					Média	Total
	0	45	90	135	180		
Sem inseto ( $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ ) B1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
Sem inseto ( $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ ) B2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
Sem inseto ( $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ ) G1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
Sem inseto ( $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ ) G2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
Com inseto ( $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ ) B1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
Com inseto ( $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ ) B2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
Com inseto ( $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ ) G1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
Com inseto ( $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ ) G2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd

Notas: nd = não detectado.

Taxas de recuperação: B1= 68%; B2= 93%; G1= 71% e G2 = 68%.

Limite de detecção: B1= 0,5  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; B2= 0,05  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ; G1= 0,5  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  e G2= 0,5  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

Observou-se que a incidência de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) em grãos de milho, com e sem infestação de insetos, não foi detectada, mesmo sendo observado o crescimento de fungos toxigênicos, conforme Tabela 12. A não incidência de aflatoxinas nos grãos de milho pode estar relacionada a alguns fatores, podendo ser que a cultivar apresentou resistência completa ou as condições climáticas, relacionadas à umidade e temperatura de armazenamento, que não sofreram alterações, não causando assim um estresse nos grãos, o que poderia provocar o desenvolvimento de aflatoxinas. Em grãos que se encontravam infestados com *Sitophilus zeamais*, observou-se que o inseto não agiu como vetor mecânico do fungo *Aspergillus ssp.*, não ocorrendo a veiculação das aflatoxinas.

Dilkin *et al.* (2000), ao realizarem um estudo de classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de aflatoxinas em híbridos de milho,

observaram que, apesar de encontrarem alta incidência de fungos no milho recém-colhido, não foram detectadas micotoxinas e que isso pode ser atribuído ao curto espaço de tempo de armazenagem para a formação das mesmas, ou número reduzido de linhagens fúngicas com potencial toxigênicos. Travaglia (2011) observou que o *A. flavus*, foi capaz de crescer nas temperaturas de 15, 20 e 42 °C, mas não de produzir aflatoxinas.

Oliveira e Koller (2011), ao verificarem a ocorrência de *aspergillus* spp. e aflatoxinas em amostras de amendoim *in natura* e paçocas, observaram que para a incidência de aflatoxinas em paçocas, os resultados não demonstraram haver relação entre a presença de fungo e as toxinas detectadas. Ramos, Brasil e Geraldine, (2008) também não encontraram correlação entre a incidência do fungo e o nível de aflatoxinas, ou seja, a presença dos fungos filamentosos não implica necessariamente que haverá a produção de micotoxinas, as mesmas estão relacionadas à capacidade de biossíntese pelo fungo e condições ambientais como alternância de temperatura, porém o risco é implícito e deve ser afastado (KAWASHIMA, 2004).

Segundo Zuber e Lillehoj (1979) e Scott e Zummo (1990), os principais fatores que levam à contaminação ou não são os métodos de amostragem, métodos de infecção (natural ou inóculo) e fatores ambientais de um dado local e ano. Portanto, segundo os autores, não é possível afirmar que híbridos que não produziram aflatoxinas em uma safra, não a produzirão em outros anos ou locais. Ramos, Brasil e Geraldine (2008), também observaram que não houve um padrão de contaminação das cultivares em diferentes locais analisados.

A resistência do híbrido à contaminação está ligada a alguns fatores que caracterizam esta resistência: endosperma rico em lisina ou amilose, presença de hidroxamatos cíclicos e fenóis (HAMMERSCHMIDT; NICHOLSON, 1977), inibidor de tripsina (CHEN; MITCHELL, 1973), conteúdo de voláteis C6-C12 (ZERINGUE, 1997), superfície do grão (BROWN *et al.*, 1993; GUO *et al.*, 1998) e inibidores de proteínas (GUO *et al.*, 1996; HUANG; WHITE; PAYNE, 1997).

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados experimentais obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- Quanto maior o período de armazenamento dos grãos de milho híbridos na presença de *S. zeamais*, maiores são as perdas nos grãos, pois se tratam de insetos primários, que são capazes de se alimentarem de grãos saudáveis e intactos provocando o rompimento do seu tegumento.
- A população de insetos aumenta conforme o tempo de armazenamento, provocando um aumento na quantidade de grãos danificados, principalmente os carunchados, levando a uma desvalorização comercial do produto e acarretando prejuízos para os produtores. Os grãos em que se encontravam infestados, foram classificados tipo III até os 45 dias de armazenamento e após isso foram classificados abaixo do nível padrão para a comercialização; os grãos sem insetos foram classificados como tipo III para o período inicial tempo 0, 90, 135 e 180 dias e tipo II para o período de 45 dias de armazenamento.
- A qualidade físico-química dos grãos é afetada diretamente pelos insetos-praga, provocando deterioração na massa de grãos, consumindo reservas, provocando um aumento no teor de água dos grãos, redução no teor de carboidratos e fibras alimentar total, aumento no teor de e um aumento na incidência de fungos filamentosos.
- A incidência de fungos filamentosos identificados como *Aspergillus* spp., foi maior em grãos infestados pelo inseto-praga, porém, após 90 dias de armazenamento ocorreram reduções drásticas do seu desenvolvimento, fato explicado pelo inseto *S. zeamais* ter se alimentado dos fungos toxigênicos.
- O *S. zeamais* não se apresentou como um vetor mecânico do fungo *Aspergillus* ssp., não ocorrendo a veiculação das aflatoxinas. Não foram detectadas aflatoxinas nos grãos com e sem infestação de insetos, não havendo correlação entre a incidência de fungos filamentosos e o nível de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2).

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sugerem-se, estudos que determinem com mais clareza como o inseto *S. zeamais* se comporta em relação ao desenvolvimento do fungo *Aspergillus* ssp., quais destes gêneros fúngicos ele se torna um vetor de veiculação de toxinas e quais dos gêneros ele tem a capacidade de se alimentar das suas estruturas.

## REFERÊNCIAS

- AJA, S.; PEREZ, G.; ROSELL, C. M. Wheat damage by *Aelia* spp. and *Erygaster* spp.: effects on gluten and water-soluble compounds released by gluten hydrolysis. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 1, p. 187-193, mar. 2004.
- ALENCAR, E. R.; FARONI, L. R. D.; FERREIRA, L. G.; COSTA, A. R. PIMENTEL, M. A. G. Qualidade de milho armazenado e infestado por *sitophilus zeamais* e *tribolium castaneum*. **Engenharia na agricultura**, Viçosa, v.19, n.1, 2011.
- ALENCAR, E. R.; FARONI, L. R. D.; FILHO, A. F. L.; PETERNELLI, L. A.; COSTA, A. R. Qualidade dos grãos de soja armazenados em diferentes condições. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 13, n. 5, p. 606-613, 2009.
- ALI, N.; YAMASHITA, A.; YOSKIZAWA, T. Natural co-occurrence of aflatoxins and fusarium mycotoxins (fumonisins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) in corn from Indonésia. **Food Additives and Contaminants**, v. 15, n. 4, p. 377-384, 1998.
- ALMEIDA FILHO, A. J.; FONTES, L. S.; ARTHUR, V. Determinação da perda de peso do milho (*Zeamays*) provocada por *Sitophilus oryzae* e *Sitophilus zeamais*. **Revista Ecosystema**, Espírito Santo do Pinhal, v. 27, n. 2, p. 41-44, 2002.
- ALVES, W. M.; FARONI, L. R. A.; CORRÊA, P. C.; QUEIROZ, D. M.; TEIXEIRA, M. M. Influência dos teores de umidade de colheita na qualidade do milho (*Zeamays* L.) durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 26, n. 2, p. 40-45, 2001.
- AMARAL, K. A. S.; NASCIMENTO, G. B.; SEKIYAMA, B. L.; JANEIRO, V.; MACHINSKI JUNIOR, M. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 336-342, 2006.
- ANTUNES, L. E. G.; VIEBRANTZ, P. C.; GOTTARDI, R.; DIONELLO, R. G. Características físico-químicas de grãos de milho atacados por *Sitophilus zeamais* durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 6, p. 615-620, 2011.
- AQUINO, S.; POTENZA, M. R. Análise da microbiota associada à entomofauna em rações a granel para animais domésticos. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 80, n. 2, p. 243-247, abr./jun. 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS MOAGEIRAS DE MILHO - ABIMILHO. **Colheita, recebimento, limpeza, secagem e armazenamento de milho**. Apucarana: Boletim Técnico, 2002. 22 p.
- ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of the Association Official Analytical Chemists**. 12 ed. Washington: AOAC, 1982. 455 p.
- BANKOLE, S. A.; ADEBANJO, A. Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it. **African Journal of Biotechnology**, Grahamstown, v. 2, n. 9, p. 254-263, 2003.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 237 p.

BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. 817 p.

BOTTON, M.; LORINI, I.; AFONSO, A.P.S. Ocorrência de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) Danificando a cultura da videira no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 355-356, 2005.

BRAGA, L. G. T.; LOPES, D. C.; COSTA, N. M. B.; PEREIRA, J. S.; TEIXEIRA, M. P. Uso de rato de laboratório para determinar o valor nutritivo do milho em diversos níveis de carunchamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, p. 331-336, 2003.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA, 2009a. p. 365.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria de Desenvolvimento Rural. **Portaria n. 11**, de 12 de abril de 1996. Comissão Técnica de Normas e Padrões. Norma de identidade, qualidade, embalagem e apresentação do milho. Brasília: MAPA, 1996. 2 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Milho**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho>. Acesso em: 11 out. 2012b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento MAPA. **Portaria n. 381**, de 28 de maio de 2009. Regulamento Técnico do Milho. Brasília: MAPA, 2009b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Deteção e identificação dos fungos de importância médica**. Ministério da Saúde. Salvador: Ministério da Saúde, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução RDC n.º 7**, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Disponível em: <http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/rdc/107502-7.html> 21/11/2012a.

BROOKER, D. B.; BAKKER-ARKEMA, F. W.; HALL, C. W. **Drying and storage of grains and oilseeds**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992. 450 p.

BROWN, R. L.; COTIY, P. J.; CLEVELAND, T.; WIOSTROM, N. W. Living maize embryo influences accumulation of aflatoxin in maize kernels. **Journal of Food Protection**, Des Moines, Iowa, v. 56, n. 11, p. 967-971, 1993.

CALDAS, G. M. M.; OLIVEIRA, R. C.; TESSMANN, D. J.; MACHINSKI JUNIOR, M. Ocorrência de patulina em uva fina (*Vitis vinifera* L. cv. "Rubi") com sinais de podridão ácida. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 1, p. 14-18, 2008.

CHEN, I.; MITCHELL, H. L. Trypsin inhibitors in plants. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 12, n. 2, p. 327-330, 1973.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira março 2013/2014**. Brasília, 2014. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 3 fev. 2014.

COSTA, A. R.; FARONI, L. R.; ALENCAR, E. R.; CARVALHO, M. C. S.; FERREIRA, L. G. Qualidade de grãos armazenados em silos bolsa. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 41, n. 2, p. 200-207, 2010.

COSTA, J. A. A.; ZANELLA, G. N. Identificação de fungos filamentosos em derivados de milho comercializados em Primavera do Leste – MT. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 93, p. 109-113, 2012.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicol. Lett**, Amsterdam, v. 127, p. 19-28, 2002.

CRUZ, J. C.; MAGALHÃES, P. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; MOREIRA, J. A. A. **Milho: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. 338 p.

CRUZ, J. V. S. **Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animais de companhia, comercializados na região de Pirassununga, Estado de São Paulo**. 2010. 73 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

dano econômico de *Sitophilus zeamais* (M.) em trigo armazenado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 6, n. 2, p. 273-279, 2002.

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

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

DOBIE, P.; HAINES, C. P.; HODGES, R. J.; PREVETT, P. F. **Insects and arachnids of tropical stored products, their biology and identification: a training manual**. London: Tropical Development and Research Institute, 1984. 131 p.

EGLI, D. B.; TEKRONY, D. M. Species differences in seed water status during seed maturation and germination. **Seed Science Research**, New York, v. 7, n. 1, p. 3-11, 1997.

ELIAS, M. C. **Manejo tecnológico da secagem e do armazenamento de grãos**. Pelotas: Santa Cruz, 2008. 457 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Embrapa Milho e Sorgo. **Sistema de Produção**, 2. 5 ed. 2009. Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho\\_5ed/economia.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_5ed/economia.htm). Acesso em: 07 mar. 2013.

EUROPEAN MYCOTOXIN AWARENESS NETWORK – EMAN. **Fact sheet 2: the aflatoxins**, 2007. Disponível em: [www.mycotoxins.org](http://www.mycotoxins.org). Acesso em 4 fev. 2014.

EVANS, D. E. The biology of stored products Coleoptera. In: **Proc. Aust. Dev. Asst. Course on Preservation of Stored Cereals**, Kansas: Kansas State University, 1981. p. 149-85.

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

FARIAS, A. X.; ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M.; ANDERSEN, P. M.; CORRÊA, T. B. S. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no Estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 3, p. 617-621, mar-2000.

FARONI, L. R. D. A. Manejo das pragas dos grãos armazenados e sua influência na qualidade do produto final. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 17, p. 36-43, 1992.

FARONI, L. R. D. A.; BARBOSA, G. N. O. ; SARTORI, M. A.; CARDOSO, F. A.; ALENCAR, E. R. Avaliação qualitativa e quantitativa do milho em diferentes condições de armazenamento. **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, v. 13, n. 3, p. 193-201, 2005.

FERRARI FILHO, E. **Métodos e temperaturas de secagem sobre a qualidade físico-química e microbiológica de grãos de milho no armazenamento**. 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado em Horticultura) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

FERREIRA, H.; PITTNER, E.; SANCHES, H. F.; MONTEIRO, M. C. Aflatoxinas: um risco a saúde humana e animal. **Revista Ambiência**, Guarapuava, v. 2, n. 1, 2006.

FONSECA, H. Pequeno histórico das micotoxinas no mundo e no Brasil. *In*: MOLIM, R.; VALENTINI, M. L. **Simpósio sobre micotoxinas em grãos**. Fundação Cargil/Fundação ABC, São Paulo, 1999. p. 208.

FREIRE, F. C. O. **Micotoxinas**: importância na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 48 p.

FREO, J. D. **Aplicação de terra de diatomácea e a infestação com *rhizopertha dominica* nas propriedades físico-químicas e tecnológicas de grãos de trigo armazenados no sistema convencional**. 2010. 107 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

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

GUO, B. Z.; BROWN, R. L.; LAX, A. R.; CLEVELAND, T. E.; RUSSIN, J. S.; WIDSTROM, N. W. Protein profiles and antifungal activities of kernel extracts from corn genotypes resistant and susceptible to *Aspergillus flavus*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, Iowa, v. 61, n. 1. p. 98-102, 1998.

GUO, B. Z.; RUSSIN, J. S.; CLEVELAND, T. E.; BROWN, R.L.; DAMANN, K. E. Evidence for cutinase production by *Aspergillus flavus* and its possible role in infection of corn kernels. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, n. 8, p. 824-829, 1996.

HAMMERSCHMIDT, R.; NICHOLSON, R. L. Resistance of maize to anthracnose: changes in host phenols and pigments. **Phytopathology**, St. Paul, v. 67, n. 2, p. 251-258, 1977.

HUANG, Z.; WHITE, D. G.; PAYNE, G. A. Corn seed proteins inhibitory to *Aspergillus flavus* and aflatoxin biosynthesis. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, n. 6, p. 622-627, 1997.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 2008. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com\\_remository&Itemid=0&func=select&orderby=1](http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=0&func=select&orderby=1). Acesso em: 5 mar. 2012.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712 p.

JOOD, S.; KAPOOR, A. C. Biological evaluation of protein quality of wheat as affected by insect infestation. **Food Chem.**, New York, v. 45, n. 3, p. 169-174, 1992.

KAWASHIMA, L. M. **Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil**. 2004. 110 p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

KUMAR, V.; BASU, M. S.; RAJENDRAN, T. P. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection**, v. 27, n. 6, p. 891-905, jun-2008.

LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. Curitiba: Paranaset, 1997. 134 p.

LORINI, I. **Controle integrado de pragas de grãos armazenados**. Passo Fundo: EMBRAPA – CNPT, 1998. 52 p.

LORINI, I. **Pragas de grãos de cereais armazenados**. Passo Fundo: EMBRAPA – CNPT, 1999. 60 p.

LORINI, I.; MIIKE, L. H.; SCUSSEL, V. M. **Armazenagem de grãos**. Campinas: IBG, 2002. 983 p.

MACHADO, C. T. T.; PATERNIANI, M. L. S. Origem, domesticação e difusão do milho. *In*: SOARES, A. C. **Milho crioulo: conservação e uso da biodiversidade**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1998. p. 185.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: Ministério da Educação; Lavras: ESAL/ FAEPE, 1988. 107 p.

MACHINSKI JUNIOR, M.; SOARES, L. M. V.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D. CASTRO, J. L.; BORTOLLETO, N. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Brazilian corn cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 81, n. 10, p. 1001-7, 2001.

MALLMANN C. A, SANTURIO JM, WENTZ, I. Aflatoxinas - Aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 24, n, 3, p. 635-643, 1994.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P.; GIACOMINI, L. Z.; RAUBER, R. H. Impacto das aflatoxinas no desempenho de três linhagens de frangos de corte. **Laboratório de Análises Micotoxicológicas** – Universidade Federal de Santa Maria (LAMIC/UFSM), 2006.

MARQUES, O. J.; FILHO, P. S. V.; DALPASQUALE, V. A.; SCAPLM, C. A.; PRICINOTTO, L. F.; MACHINSKI JUNIOR, M. Incidência fúngica e contaminações por micotoxinas em grãos de híbridos comerciais de milho em função da umidade de colheita. **Acta Sci., Agron.**, Maringá, v. 31, n. 4, p. 667-675, 2009.

MARVIN, H. J. P.; KLETER, G. A. Early awareness of emerging risks associated with food and feed production: Synopsis of pertinent work carried out within the Safe Foods project. **Food and Chemical Toxicology**, England, v. 47, p. 911-914, 2009.

MASARO JÚNIOR, A. L.; VILARINHO, A. A.; PAIVA, W. R. S. C.; BARRETO, H. C. S. Resistência de híbridos de milho ao ataque de *Sitophilus zeamais* motschulsky (coleoptera: curculionidae) em condições de armazenamento. **Rev. Acad. Ciênc. Agrár. Ambient.**, Curitiba, v. 6, n. 1, p. 45-50, jan./mar. 2008.

MATIOLI, J. C.; ALMEIDA, A. A. Alterações nas características químicas dos grãos de milho causadas pela infestação do *Sitophilus oryzae*. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 4, p. 36-46, 1979.

MILLER, J. D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 1-16, 1995.

MORENO, E. C.; GARCIA, G. T.; ONO, M. A.; VIZONI, E.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 220-226, 2009.

NASCIMENTO, V. R. G.; QUEIROZ, M. R.; MARCHI, V. C.; AGUIAR, R. H. Desempenho de estratégias de aeração de milho armazenado: fungos e condutividade elétrica. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 16, n. 1, p. 113–121, 2012.

NEETHIRAJAN, S.; KARUNAKARAN, C.; JAYAS, D.S.; WHITE, N.D.G. Detection techniques for stored-product insects in grain. **Food Control**, Oxford, v. 18, p. 157-162, 2007.

NESCI, A.; RODRIGUEZ, M.; ETCHEVERRY, M. Control of *Aspergillus* growth and aflatoxin production using antioxidants at different conditions of water activity and pH. **Journal of Applied Microbiology**, Northern Ireland, v. 95, n. 2, p. 279-287, 2003.

OKELANA, F. A.; OSUJI, F. N. C. Influence of relative humidity air 30°C on the oviposition, development and mortality of *Sitophilus zeamais* M. (Coleoptera: Curculionidae) in maize kernels. **J. Stored Prod. Res.**, Kidington, v. 21, p. 13-19, 1985.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 417-424, 1997.

OLIVEIRA, C. A. F.; SEBASTIÃO, L. S.; FAGUNDES, H.; ROSIM, R. E.; FERNANDES, A. M. Determinação de aflatoxina B1 em rações e aflatoxina M1 no leite de propriedades do Estado de São Paulo. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 30, n. 1, p.-221-225, 2011.

OLIVEIRA, L. S. F.; KOLLER, F. F. C. Ocorrência de *Aspergillus* spp. e aflatoxinas em amostras de amendoim in natura e paçocas. **Revista de Ciências Ambientais**. Canoas, v. 5, n. 1, p. 57-68, 2011.

OLIVEIRA, M. F.; LORINI, I.; MALLMANN, C. A. As micotoxinas e a segurança alimentar na soja armazenada. In: SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR, 3, 2010, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SBCTA-RS, 2010. p. 1-4.

OLIVEIRA, M. F.; LORINI, I.; MALLMANN, C. A. As micotoxinas e a segurança alimentar na soja armazenada. In: SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR, 3, 2010, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SBCTA-RS, 2010. p. 1-4.

OSBORNE, B. G. Mycotoxins and the Cereal Industry – A Review. **Journal of Food Technology**, Oxford, v. 17, p. 1-9, 1982.

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

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M. S. Melhoramento de milho. *In*: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. 817 p.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. How will climate change affect mycotoxins in food?. **Food Research Internacional**, Amsterdam, v. 43, p. 1902-1914, 2010.

PEREIRA, M. L. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **B. Ceppa**. v. 20, n. 1, p. 141-156, 2002.

PINTO, U. M.; FARONI, L. R. D. A.; ALVES, W. M.; SILVA, A. A. L. Influência da densidade populacional de *Sitophilus zeamais* (Motsch.) sobre a qualidade do trigo destinado à panificação. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, p. 1407-1412, 2002.

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

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

POSSAMAI, E. **Armazenagem de grãos**. Curitiba, 2011. Disponível em: <http://www.scribd.com/doc/85555448/18/III-DANOS-MECANICOS>. Acesso em: 18 mar. 2013.

PUZZI, D. **Abastecimento e armazenamento de grãos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 2000. 666 p.

PUZZI, D. **Conservação dos grãos armazenados**. São Paulo: Agronômica Geres, 1973. 217 p.

RADÜNZ, L. L.; DIONELLO, R. G.; ELIAS, M. C.; BARBOSA, F. F. Influência do método de armazenamento na qualidade física e biológica de grãos de milho. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 31, n. 2, p. 136-143, 2006.

RAMOS, C. R. B. A.; BRASIL, E. M.; GERALDINE, R. M. Contaminação por aflatoxinas em híbridos de milho cultivados em três regiões do estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 38, n. 2, p. 95-102, 2008.

REES, D. P. Coleoptera. *In*: SUBRAMANYAN, B.; HAGSTRUM, D.W. **Integrated management of insects in stored products**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996. p. 1-39.

REID, L. M.; NICOL, R. W.; OUELLET, T.; SAVARD, M.; MILLER, J. D.; YOUNG, J. C.; ATEWART, D. W.; SCHAAFSMA, A. W. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears: disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, n. 11, p. 1028-1037, 2009.

RESNIK, S.; NEIRA, S.; PACIN, A.; MARTINEZ, E.; APRO, N.; LATREITE, S. A survey of the natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in Argentina field maize 1983–1994. **Food Additives and Contaminants**, Oxford, v. 13, n. 1, p. 115-120, 1996.

RICHARD, J. L.; PAYNE, G. A. ; DESJARDINS, A. E.; MARAGOS, C.; NORRED, W. P.; PESTKA, J. J.; PHILLIPS, T. D.; VANEGMOND, H. P.; VARDON, P. J.; WHITAKER, T. B.; WOOD, G. **Mycotoxins**: risks in plant, animal, and human systems. Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Technology, 2003. p. 199.

RODRIGUES, P. R. A. **Gestão estratégica da armazenagem**. São Paulo: Aduaneiras, 2006.

SAINI, H. S.; WESTGATE, M. E. Reproductive development in grain crops during drought. **Advances in Agronomy**, Newark, v. 68, p. 59-96, 1999.

SANTIN, E. Micotoxicoses. *In*: BERCHIERI JR, A.; MACARI, M. (Ed). **Doenças de aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 379-388.

SANTOS, A.K.; FARONI, L.R.A.; GUEDES, R.N.C.; SANTOS, J.P.; ROZADO, A.F. Nível de

SANTOS, J. P. Controle de pragas durante o armazenamento de milho. *In*: CRUZ, J. C.;KARAM, D.; MONTEIRO, M. A. R.; MAGALHÃES, P. C. **A cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. p. 257-302.

SANTOS, J. P. Recomendação para o controle de pragas de grãos e de sementes armazenadas. *In*: BULL, L.T.; CANTARELLA, H. **Cultura do milho**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Potafos, 1993. p. 197-233.

SANTOS, J.P.; FONTES, R. A.; CRUZ, I.; FERRARI, R. A. R. Avaliação de danos e controle de pragas de grãos armazenados a nível de fazenda no Estados de Minas Gerias, Brasil. *In*: SEMINÁRIO LATINO DE PERDAS DE PÓS-COLHEITA DE GRÃOS, 1. 1983. Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa: CENTREINAR, 1983. p. 105-110.

SCHÖLLER, M.; PROSELL, S.; AL-KIRSHI, A. G.; REICHMUTH, C. H. Towards biological control as a major component of integrated pest management in stored product protection. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 33, p. 81-97, 1997.

SCOTT, G. E.; ZUMMO, N. Preharvest kernel infection by *Aspergillus flavus* for resistant and susceptible maize hybrids. **Crop Science**, Madinson, v. 30, n. 2, p. 381-383, 1990.

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

SEOK-HO PARK; FRANK, H. A.; SCOTT, R. B.; TILMAN, J. S. Impact of differing population levels of *Rhizopertha dominica* (F.) on milling and physicochemical properties of sorghum kernel and flour. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 44, n. 4, p.322-327, 2008.

SILVA, A. A. L.; FARONI, L. R. D. A.; GUEDES, R. N. C.; MARTINS, J. H.; PIMENTEL, M. A. G. Modelos analíticos do crescimento populacional de *Sitophilus zeamais* em trigo armazenado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, p. 155-161, 2006.

SILVA, A. A. L.; FARONI, L. R. D. A.; GUEDES, R. N. C.; MARTINS, J. H.; PIMENTEL, M. A. G. Modelagem das perdas causadas por *Sitophilus zeamais* e *Rhizopertha dominica* em trigo armazenado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 7, p. 292-296, 2003.

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

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

SILVA, J. S.; AFONSO, A. D. L.; GUIMARÃES, A. C. Estudos dos métodos de secagem. *In*: SILVA, J. S. **Pré-processamento de produtos agrícolas**. Juiz de Fora: Instituto Maria, 1995. p. 105-143.

SILVA, J. S.; BERBERT, P. A.; AFONSO, A. D. L.; RUFATO, S. **Secagem e armazenagem de produtos agrícolas**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2000. p. 261-277.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. 552 p.

SILVEIRA, R. D.; FARONI, L. R. D. A.; PIMENTAL, M. A. G.; ZOCOLO, G. J. Influência da temperatura do grão de milho, no momento da pulverização, e do período de armazenamento, na mortalidade de *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum*, pela mistura bifenthrin e pirimifós-metil. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 31, p. 120-124, 2006.

SMITH, J. E.; MOSS, M. O. Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance. **Journal of Basic Microbiology**, Toronto, v. 26, p. 312, 1986.

SWAMINATHAN, M. Effect of insect infestation on weight loss, acceptability and nutritive value of food grains. **Indian J. Nutr. Dietet**, Coimbatore, v. 14, p. 205-216, 1977.

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

TEIXEIRA A. Adequação e apresentação de parâmetros de validação intralaboratorial de um ensaio para a quantificação de aflatoxinas em Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) através de cromatografia líquida de alta eficiência. 2008. 57f. Dissertação (Mestrado) Instituto de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropólia, 2008.

TRAVAGLIA, D. P. **Crescimento de *aspergillus flavus* e produção de aflatoxinas em grãos de milho armazenados sob diferentes temperaturas**. 2011. 64 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

TUBAJIKA, K. M.; MASCAGNI JUNIOR, H. J.; DAMANN, K. E.; RUSSIN, J. S. Susceptibility of commercial corn hybrids to aflatoxin contamination in Louisiana. **Cereal Research Communications**, v. 28, n. 4, p. 463- 467, 2000.

UNIÃO EUROPEIA, **Regulamento (CE) Nº. 401/2006, da comissão de 23 de Fevereiro de 2006**. Estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos gêneros alimentícios. Disponível em: [file:///C:/Users/Documents/Downloads/R\\_CE\\_401\\_2006\\_Uniao%20Europeia.pdf](file:///C:/Users/Documents/Downloads/R_CE_401_2006_Uniao%20Europeia.pdf). Acesso em: 23 maio 2014.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA. **Tabela brasileira de composição de alimentos** - TACO. 4. ed. Campinas: NEPA/UNICAMP, 2011. 161 p.

VENDRAMIM, J. D. O controle biológico e a resistência de plantas. *In*: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. **Controle biológico no Brasil**: parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 2002. p. 511-528. cap. 30.

WEHLING, R. L.; WETZEL, D. L.; PEDERSEN, J. R. *et al.* Stored wheat insect infestation related to uric acid as determined by liquid chromatography. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, Gaithersburg, v. 68, p. 644-647, 1984.

ZERINGUE JUNIOR, H. J. Volatile antifungal compounds in maize kernels: effect of ear position on aflatoxina production. **Journal of AOAC Internacional**, Arlington, v.80, n. 2, p.341-344, 1997.

ZLOTOWSKI, P.; CORRÊA, A. M. R.; ROZZA, D. B.; DRIEMEIER, D.; MALLMANN, C. A.; MIGLIAVACCA, F. A. Surto de aflatoxicose em suínos no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, out./dez. 2004.

ZUBER, M. S.; LILLEHOJ, E. B. Status of the aflatoxina problem in corn. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 8, n. 1, p. 1-5, 1979.