

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA
SISTEMAS AGROECOLÓGICOS E INDUSTRAIS

QUALIDADE E SEGURANÇA ALIMENTAR DO MILHO EM DIFERENTES
ACONDICIONAMENTOS DE ARMAZENAGEM

ADRIANA SBARDELOTTO DI DOMENICO

CASCAVEL

2014

ADRIANA SBARDELOTTO DI DOMENICO

**QUALIDADE E SEGURANÇA ALIMENTAR DO MILHO EM DIFERENTES
ACONDICIONAMENTOS DE ARMAZENAGEM**

Tese submetida em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Agrícola, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, área de concentração Sistemas Biológicos e Agroindustriais, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Cascavel.

Orientador: Dr. Divair Christ
Coorientador: Dr. Cleverson Busso

CASCADEL

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central do Campus de Cascavel - Unioeste
Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejo – CRB 9ª/965¹

D536q	<p>Di Domenico, Adriana Sbardelotto Qualidade e segurança alimentar do milho em diferentes acondicionamentos de armazenagem./Adriana Sbardelotto Di Domenico. — Cascavel, 2014. 150 p. Orientador: Prof. Dr. Divair Christ Coorientador: Cleverson Busso Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Programa de Pós-graduação Strictu Sensu em Engenharia Agrícola</p> <p>1. Zea mays L. 2. Armazenamento. 3. Micotoxinas. 4. Grãos. 5. Fungos.6. Pós-colheita.7. Alimentos – Inocuidade. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD 21.ed.633.15</p>
-------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

¹ Professor Ms. José Carlos da Costa. Revisor de normas e das línguas Portuguesa e Inglesa.

ADRIANA SBARDELOTTO DI DOMENICO

"Qualidade e segurança alimentar do milho em diferentes acondicionamentos de armazenagem"

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação "*Stricto Sensu*" em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de doutora 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



Prof.ª. Dra. Marcela Tostes Frata
Coordenação de Agronomia, UTFPR



Prof. Dr. Fernando Carlos de Sousa
Coordenação de Ciências Biológicas, UTFPR



Prof. Dr. Cleverson Busso
Coordenação de Ciências Biológicas, UTFPR



Prof.ª. Dra. Silvia Renata Machado Coelho
Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Unioeste

Cascavel, 28 de novembro 2014.

BIOGRAFIA RESUMIDA

Adriana Sbardelotto Di Domenico, nasceu em 25 de agosto de 1983, no município de Dois Vizinhos, estado do Paraná. Gradou-se em Licenciatura em Matemática no Centro Federal de Ensino Tecnológico (CEFET), *campus* de Pato Branco, no período de 2001 a 2004. Especializou-se em Matemática e Física pela Faculdade Estadual de Ciências e Letras de Paranaíba (FAFIPA) no ano de 2005. cursou Mestrado em Modelagem Matemática na Universidade Regional do Noroeste do Rio Grande do Sul (UNIJUI), *campus* de Ijuí- RS no período de 2005 a 2006.

É professora da área de matemática desde 2006, com atuações no ensino fundamental, médio, técnico e superior de instituições públicas e privadas (SENAI, FAF, UNISE, UNIOESTE-substituto, SEED - Estado do Paraná celetista e QPM- concursada, UTFPR - DV substituto).

Desde 2009, é professora efetiva de matemática/cálculo/estatística da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Dois Vizinhos, em regime de dedicação exclusiva.

Em 2011, ingressou no doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), *campus* de Cascavel.

Acabou...
Mais uma fase vencida e concluída.
Mais um ciclo fechado!
Obrigada meu Deus por possibilitar perseverança e sabedoria, embora não tenha
sido fácil...
Que venham os próximos períodos e com estes novas conquistas!

Adaptado de: **Míriam Passos**

“A persistência é o caminho do êxito.”
Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, pela oportunidade de ter realizado este curso e por guiar-me em todos os momentos.

Ao meu marido Eloirso, pelo auxílio, companheirismo, parceria, paciência e compreensão nos momentos difíceis.

Aos meus pais e demais familiares, pelo incentivo e auxílio.

Ao Professor Dr. Divair Christ, pela orientação, confiança, incentivo, por compartilhar seus conhecimentos e sua amizade;

Ao Professor Dr. Cleverson Busso, pela co-orientação, acolhimento, paciência, incentivo, acessibilidade, prestatividade e amizade;

À professora Dra. Elisabete Hiromi Hashimoto, por me ensinar à metodologia empregada nas análises microbiológicas de isolamento de fungos em matriz milho.

À Professora Dra. Sílvia, por ter disponibilizado o Laboratório de Controle de Qualidade da UNIOESTE para realização das análises toxicológicas, bem como, o auxílio de muitas dúvidas ao longo das análises.

Aos colegas responsáveis pelos laboratórios da UTFPR – DV, Marcela Frata, Cleverson Busso, Laércio Ricardo Sartor, Wagner Paris, Marcos Aurélio Mathias de Souza, Jean Carlo Possenti, Carlos Alberto Casali, Magali Floriano da Silveira, Marcelo Montagner e Paulo César Conceição, que prontamente disponibilizaram os laboratórios para que eu fizesse uso nesta pesquisa.

Aos alunos voluntários que prestativamente me auxiliaram nas árduas tarefas de laboratório, Valéria Frucalso, Graziela Gomes, Jackson Fernando Gomes, Tayrane Cassana Sebastião, Rafael Fagoni Biancalana, Tiane Refatti, Fernanda Bertan, Isadora Oenning, Aline Balbinoti, Jonas J. Minuzzo e, em especial, aos que trabalharam incansavelmente por mais de 8 meses, Alex Junior Bachi, Andreilissa Gorette Castanha e Tayana Mensor.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), *campus* de Cascavel, em especial ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, pela oportunidade de realização do curso;

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), *campus* Dois Vizinhos, pela disponibilização da sala de armazenagem e dos laboratórios para a realização das análises físico-químicas e microbiológicas, e ainda pela concessão da licença para findar este trabalho de pesquisa.

QUALIDADE E SEGURANÇA ALIMENTAR DO MILHO EM DIFERENTES ACONDICIONAMENTOS DE ARMAZENAGEM

RESUMO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de grãos e o milho é o segundo grão mais produzido no país. Como este cereal está diretamente relacionado à base alimentar humana e animal, surgem muitas preocupações a respeito da manutenção de sua qualidade no pós-colheita, em especial ao longo do armazenamento, com aumento das atenções à segurança alimentar. Apesar disso, muitas vezes o milho é armazenado nas propriedades rurais, em condições inadequadas, exposto a perdas quantitativas e qualitativas, ao desenvolvimento de fungos toxigênicos e à contaminação por aflatoxinas, substância capaz de causar graves danos à saúde humana e animal, além de inúmeros prejuízos agropecuários. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar alternativas de armazenagem, viáveis a propriedades rurais, através de dois experimentos de armazenagem (safra de inverno 2012 e safra de verão 2012/2013), nos quais se avaliou a qualidade do milho armazenado em diferentes acondicionamentos, por 12 meses. O delineamento experimental utilizado foi um fatorial 4 x 5, cujos fatores foram quatro tipos de acondicionamentos de armazenagem (sacarias convencionais, bolsas seladas hermeticamente, silo metálico e espigas) e cinco períodos de tempo (0, 3, 6, 9 e 12 meses). Utilizaram-se dois híbridos de milho (2B688RR, 30K73Hx) cultivados na microrregião de Dois Vizinhos, sudoeste do Paraná. A armazenagem foi realizada em condições ambientais e os parâmetros avaliados foram: teor de água, cinzas, proteínas, lipídios, grãos sem defeitos, peso volumétrico, peso de mil grãos, contagem de *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., total de bolores e leveduras e ocorrência de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂). Os resultados obtidos em cada experimento, quando atendiam às pressuposições do modelo matemático, eram avaliados pelo emprego da análise de variância e as diferenças entre as médias ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey, a 5% de significância, quando não, pelo teste de Kruskal-Wallis, também a 5% de significância. Além disso, realizou-se a análise dos componentes principais (ACP) para verificar quais das variáveis avaliadas, eram responsáveis pelas maiores variações na qualidade do milho armazenado. Verificou-se, em ambos os armazenamentos, que os grãos de milho acondicionados em bolsas herméticas apresentaram o menor teor de água. Independente do acondicionamento e do híbrido de milho houve aumento do conteúdo de cinzas dos grãos, redução da percentagem de grãos sem defeitos e do peso volumétrico. Constatou-se a incidência de *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., respectivamente, em 20,37, 86,11 e 94,44% das amostras de milho do armazenamento safra de inverno; em 83,3, 91,6 e 90,07% das amostras do armazenamento safra de verão, respectivamente. O *Aspergillus* sp. foi detectado somente aos 3 meses de armazenagem no primeiro experimento, enquanto no segundo desde a colheita. A ocorrência de *Fusarium* sp. tendeu a diminuir durante a armazenagem e a de *Penicillium* sp. foi maior no milho acondicionado em espigas. Não houve influência dos tipos de acondicionamentos e do tempo de armazenagem na ocorrência de *Aspergillus* sp. e de aflatoxinas no milho do armazenamento safra de inverno. Já o milho acondicionado em espigas do armazenamento safra de verão apresentou a menor contagem de *Aspergillus* sp. e não apresentou aflatoxinas. Os níveis de aflatoxinas (B₁+B₂+G₁+G₂) detectados variaram de 2,87 a 14,45 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e de 3,03 a 197,51 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente no milho dos armazenamentos safra de inverno e safra de verão, além disso, nenhuma das amostras do primeiro armazenamento apresentou contaminação acima de 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$. No segundo armazenamento, 41 amostras apresentaram contaminação. Resultados atribuídos, principalmente, às diferentes condições climáticas dos períodos de cultivo dos híbridos de milho (safra de verão e safra de inverno) e dos experimentos de armazenagem, a disparidade na incidência de *Aspergillus* sp. e na contaminação por aflatoxinas. Conclui-se, pela ACP, que todas as variáveis aferidas neste trabalho têm importância na qualidade do milho armazenado.

PALAVRAS-CHAVE: armazenamento, micotoxinas, fungos, grãos, *Zea mays* L., pós-colheita e inocuidade dos alimentos.

FOOD QUALITY AND SAFETY OF MAIZE IN DIFFERENT TYPES OF STORAGE

ABSTRACT

Brazil is one of the largest producers of grains, and maize is the second most produced grain in the country. As this cereal is directly related to human and animal food basis, many matters appear on the maintenance of their post-harvest quality, especially during storage, due to the increased attention to food safety. Despite this importance, maize is often stored on farms in inappropriate conditions, exposed to quantitative and qualitative losses, the development of toxigenic fungi and aflatoxin contamination, a substance capable of causing severe damage to human and animal health, as well as many agribusiness losses. The objective of this research was evaluating storage alternatives viable to farms through two storage experiments (2012 winter crop 2012/2013 summer harvests), for assessment of the quality of stored maize in different packings for 12 months. The experimental design was a 4 x 5 factorial, whose factors were four types of packaging storage (conventional sacks, bags hermetically sealed, metallic silo and cobs) and five time periods (0, 3, 6, 9 and 12 months). Two maize hybrids (2B688RR, 30K73Hx) cultivated in the region of the town of Dois Vizinhos were used, in the southwest of Paraná. The storage was conducted in ambient conditions and the following parameters were evaluated: water content, ash, protein, fat, grains without defects, volumetric weight, one-thousand grains weight, counting of *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, total of molds and yeasts and occurrence of aflatoxins (B1, B2, G1 and G2). The results obtained in each experiment, when attended the presuppositions of the mathematical model, were evaluated by use of analysis of variance and differences between means ($p < 0.05$) by Tukey test at 5% significance level, and when not attended them, by Kruskal-Wallis also at 5% significance level. Furthermore, the Principal Component Analysis (PCA) was done to determine which of the variables evaluated was responsible for the largest variations in the quality of stored maize. It was found in both storages that maize kernels placed in sealed bags presented the lowest water content. Also that regardless of packaging and hybrid maize, there were an increase in ash content of grains and the decrease of the percentage of grains without defects and volumetric weight. It was detected the incidence of *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.* and *Penicillium sp.*, respectively 20.37, 86.11 and 94.44% of the samples of maize season winter storage, and in 83.3, 91.6 and 90.07% of the samples from the summer season storage. *Aspergillus sp.* was only detected after 3 months of storage in the first experiment, while in the second since harvesting. The occurrence of *Fusarium sp.* tended to decrease during storage, and *Penicillium sp.* was higher in corn conditioning in cobs. There was no influence of types of packaging and storage time on the occurrence of *Aspergillus sp.* and aflatoxins in maize season winter storage. However, the conditioning in maize cobs of season storage summer had the lowest count of *Aspergillus sp.* and did not present aflatoxin. Aflatoxins ($B_1 + B_2 + G_1 + G_2$) detected ranged from 2.77 to 14.45 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and from 3.03 to 197.51 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectively in the maize storage winter and summer. Besides this, none of the samples of the first storage showed contamination higher than 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, while in the second 41 samples presented higher values. The results are due to the different climatic conditions of the periods of cultivation of hybrid maize (summer and winter seasons) and storage experiments, the disparity in the incidence of *Aspergillus sp.* and aflatoxin contamination. The conclusion is that by ACP all variables assessed in this study are important for the quality of stored maize.

Key-words: storage, mycotoxins, fungi, grains, *Zea mays* L., post-harvest and food safety.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 O milho	5
3.2 Armazenagem de grãos	8
3.3 Fungos	11
3.4 Micotoxinas	15
3.5 Aflatoxinas.....	20
3.6 Ocorrência de aflatoxinas em milho e derivados.....	23
3.7 Relatos de aflatoxicoses e implicações na produção pecuária	27
3.8 Metodologias para detecção de aflatoxinas	30
3.9 Análise dos componentes principais (ACP)	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Caracterização da pesquisa	34
4.2 Caracterização das amostras	35
4.3 Caracterização da armazenagem	36
4.4 Análises realizadas.....	38
4.5 Metodologias empregadas nas análises	39
4.5.1 Determinação do teor de água	39
4.5.2 Preparo das amostras para as análises do teor de cinzas, lipídios e proteínas .	39
4.5.3 Determinação do teor de cinzas ou matéria mineral	39
4.5.4 Determinação do teor de lipídios ou extrato etéreo.....	40
4.5.5 Determinação do teor de proteínas.....	40
4.5.6 Peso volumétrico ou massa específica	40
4.5.7 Peso de mil grãos.....	40
4.5.8 Grãos sem defeito	41
4.6 Metodologias para isolamento e identificação dos gêneros <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Fusarium</i>	41
4.7 Metodologias para análise de aflatoxinas	42

4.8	Análises estatísticas	43
4.8.1	Delineamento experimental	43
4.8.2	Análise de variância e teste de médias.....	44
4.8.3	Análise dos componentes principais.....	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
5.1	Armazenamento do milho safra de inverno ou safrinha	46
5.1.1	Condições climáticas durante o armazenamento do milho safra de inverno	46
5.1.2	Atributos de qualidade dos grãos de milho armazenados na safra de inverno...	47
5.1.2.1	Teor de água	47
5.1.2.2	Conteúdo de cinzas ou matéria mineral.....	49
5.1.2.3	Conteúdo de lipídios ou extrato etéreo	51
5.1.2.4	Conteúdo de proteínas	52
5.1.2.5	Percentagem de grãos sem defeito	54
5.1.2.6	Peso volumétrico ou massa específica ou densidade.....	55
5.1.2.7	Peso de mil grãos.....	57
5.1.3	Microbiota: perfil geral	58
5.1.3.1	<i>Aspergillus</i> sp. nos diferentes acondicionamentos de armazenagem	62
5.1.3.2	<i>Fusarium</i> sp. nos diferentes acondicionamentos de armazenagem.....	63
5.1.3.3	<i>Penicillium</i> sp. nos diferentes acondicionamentos de armazenagem.....	65
5.1.3.4	Contagem total de bolores e leveduras nos diferentes acondicionamentos de armazenagem.....	66
5.1.4	Ocorrência de aflatoxinas (B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂).....	67
5.1.5	Considerações sobre o armazenamento do milho safra de inverno.....	71
5.2	Armazenamento do milho safra de verão	72
5.2.1	Condições climáticas durante o experimento de armazenamento do milho safra de verão	73
5.2.2	Atributos de qualidade dos grãos de milho armazenados na safra de verão	73
5.2.2.1	Teor de água	74
5.2.2.2	Conteúdo de cinzas ou matéria mineral.....	76
5.2.2.3	Conteúdo de lipídios ou extrato etéreo	77
5.2.2.4	Conteúdo de proteínas	79
5.2.2.5	Percentagem de grãos sem defeito	82
5.2.2.6	Peso volumétrico ou massa específica ou densidade.....	83
5.2.2.7	Peso de mil grãos.....	85
5.2.3	Microbiota: perfil geral	87
5.2.3.1	<i>Aspergillus</i> sp. nos diferentes acondicionamentos de armazenagem	89
5.2.3.2	<i>Fusarium</i> sp. nos diferentes acondicionamentos de armazenagem.....	91

5.2.3.3	<i>Penicillium</i> sp. nos diferentes acondicionamentos de armazenagem.....	92
5.2.3.4	Contagem total de bolores e leveduras nos diferentes acondicionamentos de armazenagem.....	94
5.2.4	Ocorrência de aflatoxinas (B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂).....	95
5.2.5	Considerações sobre o armazenamento do milho safra de verão.....	101
5.3	Principais aspectos entre os experimentos de armazenagem	102
5.4	Análise dos componentes principais (ACP)	108
5.4.1	Componentes principais das características de qualidade do híbrido de milho 2B688RR no armazenamento da safra de inverno	108
5.4.2	Componentes principais das características de qualidade do híbrido de milho 30K73Hx no armazenamento da safra de inverno	112
5.4.3	Componentes principais das características de qualidade do híbrido de milho 2B688RR no armazenamento da safra de verão	116
5.4.4	Componentes principais das características de qualidade do híbrido de milho 30K73Hx no armazenamento da safra de verão.....	118
5.4.5	Aspectos relevantes entre híbridos e experimentos de armazenagem na qualidade do milho segundo ACP	120
6	CONCLUSÕES	122
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	124
	REFERÊNCIAS	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Limites máximos de tolerância (%) para classificação de grãos de milho pela Instrução Normativa nº 60/ 2011 MAPA.....	7
Tabela 2	Teor de água (%) ⁽¹⁾ dos grãos de milho submetidos aos diferentes acondicionamentos de armazenagem, durante 12 meses.....	48
Tabela 3	Percentagem média ⁽²⁾ de cinzas* dos grãos de milho submetidos a diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses.....	50
Tabela 4	Percentagem média ⁽³⁾ de lipídios* dos grãos de milho submetidos a diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses.....	51
Tabela 5	Percentagem média ⁽⁴⁾ de proteínas* dos grãos de milho do híbrido 2B688RR submetidos a diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses	53
Tabela 6	Percentagem média ⁽⁵⁾ de proteínas* dos grãos de milho do híbrido 30k73Hx submetidos a diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses	53
Tabela 7	Percentagem média ⁽⁶⁾ de grãos sem defeito em amostra do híbrido 2B688RR submetido a diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses	54
Tabela 8	Percentagem média de grãos sem defeito do híbrido de milho 30K73Hx durante 12 meses de armazenagem ⁽⁷⁾	55
Tabela 9	Percentagem média de grãos sem defeito ⁽⁸⁾ do híbrido de milho 30K73Hx nos diferentes tipos de acondicionamentos de armazenagem	55
Tabela 10	Peso volumétrico dos grãos ⁽⁹⁾ de milho (kg m^{-3}) submetidos a diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses.....	56
Tabela 11	Peso de mil grãos (g) ⁽¹⁰⁾ de milho submetido a diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses.....	58
Tabela 12	Incidência (%) e contagem (UFC g^{-1}) de bolores nos grãos de milho dos híbridos 2B688RR e 30K73Hx após a secagem (início da armazenagem) e durante os 12 meses de armazenagem	60
Tabela 13	Teor de água (%) ⁽¹²⁾ dos grãos de milho submetidos aos diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses.....	75
Tabela 14	Percentagem média de cinzas do híbrido de milho 2B688RR durante 12 meses de armazenagem ⁽¹³⁾	76

Tabela 15	Percentagem média de cinzas do híbrido de milho 2B688RR nas diferentes formas de armazenagem ⁽¹⁴⁾ 76
Tabela 16	Percentagem média ⁽¹⁵⁾ de cinzas* dos grãos do híbrido de milho 30K73Hx submetidos a diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses 77
Tabela 17	Percentagem média ⁽¹⁶⁾ de lipídios* dos grãos do híbrido de milho 2B688RR submetidos a diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses 78
Tabela 18	Percentagem média de lipídios do híbrido de milho 30K73Hx durante 12 meses de armazenagem ⁽¹⁷⁾ 79
Tabela 19	Percentagem média de lipídios ⁽¹⁸⁾ do híbrido de milho 30K73Hx nas diferentes formas de armazenagem 79
Tabela 20	Percentagem média ⁽¹⁹⁾ de proteínas* dos grãos do híbrido de milho 2B688RR submetidos a diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses 80
Tabela 21	Percentagem média de proteínas ⁽²⁰⁾ nos grãos do híbrido de milho 30K73Hx durante 12 meses de armazenagem 81
Tabela 22	Percentagem média de proteínas ⁽²¹⁾ dos grãos do híbrido de milho 30K73Hx nas diferentes formas de armazenagem 81
Tabela 23	Percentagem média ⁽²²⁾ de grãos de milho sem defeitos nos diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses 83
Tabela 24	Peso volumétrico dos grãos ⁽²³⁾ de milho (kg m^{-3}) submetidos a diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses 84
Tabela 25	Peso de mil grãos ⁽²⁴⁾ de milho (g) submetidos a diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses 86
Tabela 26	Incidência (%) e contagem (UFC g^{-1}) de bolores nos grãos de milho dos híbridos 2B688RR e 30K73Hx após a colheita, após a secagem (início da armazenagem) e durante os 12 meses de armazenagem 88
Tabela 27	Componentes principais (CP), autovalores ($\lambda_i^{(1)}$), proporção da variância explicada por cada componente e acumulada, para cada híbrido de milho (2B688RR e 30K73Hx) nos dois experimentos de armazenagem (safra de inverno e safra de verão) 111
Tabela 28	Coefficientes de correlação dos componentes principais (CPs que possuem $\lambda \geq 1$) com as catorze características de qualidade dos híbridos milho (2B688RR e 30K73Hx), durante os armazenamentos safra de inverno e safra de verão 115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Anatomia do grão de milho.	5
Figura 2	Fatores que afetam a ocorrência de micotoxinas na cadeia de alimentos.	18
Figura 3	Estrutura química das Aflatoxinas (A) B ₁ , (B) B ₂ , (C) G ₁ e (D) G ₂	22
Figura 4	Dados climatológicos (temperatura média mensal (°C), UR média mensal (%), índice pluviométrico mensal (mm)) referentes aos períodos de cultivo dos híbridos de milho utilizados nos experimentos de armazenagem. (a) Safra de inverno 2012 (plantio em 25/01/2012 e colheita em 28/06/2012); (b) Safra de verão 2013/14 (plantio em 17/09/2012 e colheita em 18/02/2013).	35
Figura 5	Secagem natural ao sol das amostras de milho em grãos e espigas.	36
Figura 6	Condições climatológicas (temperatura média mensal (°C), UR média mensal (%), índice pluviométrico mensal (mm)) durante os experimentos de armazenagem. (a) Safra de inverno (julho/2012 a julho/2013); (b) Safra de verão (fevereiro/2013 a fevereiro/2014).	37
Figura 7	Tipos de acondicionamentos de armazenagem utilizados nos experimentos de armazenagem. (a) em sacarias convencionais de polipropileno; (b) em mini silos metálicos; (c) em bolsas de polietileno seladas hermeticamente; (d) em espigas.	38
Figura 8	Contagem média de colônias <i>Aspergillus</i> sp. ($\times 10^3$ UFC g ⁻¹) no milho do armazenamento safra de inverno, em diferentes acondicionamentos e tempos de armazenagem para os híbridos de milho: (a) 2B688RR (b) 30K73Hx.	63
Figura 9	Contagem média de colônias <i>Fusarium</i> sp. no milho do armazenamento safra de inverno, em diferentes acondicionamentos e tempos de armazenagem para os híbridos de milho: (a) 2B688RR ($\times 10^4$ UFC g ⁻¹) (b) 30K73Hx ($\times 10^3$ UFC g ⁻¹).	64
Figura 10	Contagem média de colônias <i>Penicillium</i> sp. no milho do armazenamento safra de inverno, em diferentes acondicionamentos e tempos de armazenagem para os híbridos de milho: (a) 2B688RR ($\times 10^4$ UFC g ⁻¹) (b) 30K73Hx ($\times 10^3$ UFC g ⁻¹).	66
Figura 11	Contagem média de bolores e leveduras ($\times 10^4$ UFC g ⁻¹) no milho do armazenamento safra de inverno, em diferentes acondicionamentos e tempos de armazenagem para os híbridos de milho: (a) 2B688RR (b) 30K73Hx.	67

Figura 12	Ocorrência de aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) em $\mu\text{g kg}^{-1}$, nas amostras de milho dos híbridos 2B688RR e 30K73HX, durante o armazenamento safra de inverno nos diferentes acondicionamentos de armazenagem (SC: sacarias convencionais; BH: bolsas hermeticas; S: silos metálicos; E: espigas), os números (1,2 ou 3) compreendem a repetição do tratamento no respectivo tempo.....	69
Figura 13	Número de países do mundo com limite máximo de tolerância nos alimentos (a) para a soma das Aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) (b) para Aflatoxina B_1	70
Figura 14	Ocorrência média de aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) no milho durante o armazenamento de inverno, em diferentes acondicionamentos de armazenagem para os híbridos de milho: (a) 2B688RR (b) 30K73Hx.	71
Figura 15	Contagem média de colônias <i>Aspergillus</i> sp. ($\times 10^3$ UFC g^{-1}) no milho durante o armazenamento de verão, em diferentes acondicionamentos e tempos de armazenagem para os híbridos de milho: (a) 2B688RR (b) 30K73Hx.	91
Figura 16	Contagem média de colônias <i>Fusarium</i> sp. ($\times 10^4$ UFC g^{-1}) no milho durante o armazenamento de verão, em diferentes acondicionamentos e tempos de armazenagem para os híbridos de milho: (a) 2B688RR (b) 30K73Hx.	92
Figura 17	Contagem média de colônias <i>Penicillium</i> sp. ($\times 10^4$ UFC g^{-1}) no milho durante o armazenamento de verão, em diferentes acondicionamentos e tempos de armazenagem para os híbridos de milho: (a) 2B688RR (b) 30K73Hx.	93
Figura 18	Contagem média de bolores e leveduras ($\times 10^4$ UFC g^{-1}) no milho durante o armazenamento de verão, em diferentes acondicionamentos e tempos de armazenagem para os híbridos de milho: (a) 2B688RR (b) 30K73Hx.	95
Figura 19	Ocorrência de aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) em $\mu\text{g kg}^{-1}$, nas amostras de milho do híbrido 2B688RR durante o armazenamento de verão, nos diferentes acondicionamentos e tempos de armazenagem (SC: sacarias convencionais; BH: bolsas seladas hermeticamente; S: silos metálicos; G: amostras em grão do início da armazenagem), os números (1,2 ou 3) compreendem a repetição do tratamento no respectivo tempo.	98
Figura 20	Ocorrência de aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) em $\mu\text{g kg}^{-1}$, nas amostras de milho do híbrido 30K73Hx, durante o armazenamento de verão, nos diferentes acondicionamentos e tempos de armazenagem (SC: sacarias convencionais; BH: bolsas seladas hermeticamente; S: silos metálicos; G: amostras em grão do início da armazenagem), os números (1,2 ou 3) compreendem a repetição do tratamento no respectivo tempo.	99

- Figura 21** Ocorrência média de aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) durante no milho durante o armazenamento de verão, em diferentes acondicionamentos e tempos de armazenagem para os híbridos de milho: (a) 2B688RR (b) 30K73Hx. 101
- Figura 22** Condições climáticas (temperatura média mensal (°C) e umidade relativa do ar (UR) média mensal(%)) durante os 12 meses de armazenagem para os dois experimentos. Exp I: Armazenamento safra de inverno (jul/2012 a jul/2013); Exp II: Armazenamento safra de verão (fev/2013 a fev/2014). 103

1 INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca no cenário mundial como um dos maiores produtores de milho (*Zea mays* L.), cereal altamente nutritivo e potencialmente energético, utilizado na alimentação humana e, com importância essencial, na alimentação animal, onde é ingrediente predominante na formulação de rações.

Como as safras de milho são sazonais e o abastecimento da cadeia alimentar ocorre ao longo de todo ano, esse cereal precisa ficar armazenado. Nesse cenário, as condições de armazenamento são determinantes na qualidade final do produto, uma vez que a massa de grãos é um sistema vivo, com influências mútuas de variáveis físicas (temperatura, umidade do grão, umidade relativa do ar, clima, capacidade de sorção, porosidade e estrutura do armazém), variáveis químicas (disponibilidade de oxigênio intergranular); biológicas de fontes internas (longevidade, respiração, maturação e germinação); e biológicas de fontes externas (fungos, leveduras, bactérias, insetos, ácaros, roedores e pássaros) (FARONI, 1998).

Por ser o milho um dos cereais mais expostos ao desenvolvimento de fungos toxigênicos, tanto na lavoura quanto no armazenamento, e o Brasil um país que possui clima diversificado (equatorial, tropical e temperado), em que as várias condições climáticas favorecem o crescimento dos principais fungos produtores de micotoxinas, têm-se uma preocupação em termos de segurança no consumo deste alimento. Como o armazenamento é necessário e pode ocorrer por períodos longos de até dois anos, ele constitui uma das etapas determinantes na preservação da qualidade físico-química e sanitária do milho, sendo necessário determinar quais condições de armazenagem melhor mantêm a qualidade desse cereal.

Alimentos contaminados por micotoxinas, metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos, podem causar graves danos à saúde humana e animal, cujos efeitos variam com a quantidade, frequência de ingestão, concentração e tipo de micotoxina, sendo que em maior grau podem ser letais. A ingestão de micotoxinas pelos humanos pode ocorrer de forma direta através do consumo de cereais como o milho e derivados que estejam contaminados ou de forma indireta, pelo leite, ovos e carne produzidos por animais que consumiram rações contaminadas (MAZIERO; BERSOT, 2010).

Na região sudoeste do Paraná, verifica-se nas pequenas propriedades rurais que parte do milho produzido tem como finalidade direta compor o arraçoamento dos animais ali produzidos, deste modo, após a colheita o milho é armazenado na propriedade, em forma

de espiga ou grão. Muitas vezes em condições precárias de armazenamento, com ausência de aeração, com umidade e temperatura inadequadas, fatores que podem comprometer a qualidade sanitária do grão, propiciando o desenvolvimento de fungos toxigênicos produtores de micotoxinas, que podem causar grandes prejuízos nas propriedades, gerando danos à saúde animal e conseqüente perda de produtividade.

Essa região contempla várias atividades pecuárias como: avicultura de corte e de postura, suinocultura, piscicultura, bovinocultura de leite e de corte, ovinocultura e coturnicultura. Algumas dessas atividades possuem assistência técnica periódica, com fornecimento de ração pela empresa integradora (ex: suinocultura, avicultura de corte e postura), existindo políticas de controle de qualidade com uso de adsorventes (aditivos utilizados em rações, que impedem que a micotoxina presente seja absorvida pelo trato gastrointestinal), favorecendo, assim, a segurança alimentar dos animais. Entretanto, nas demais atividades pecuárias a assistência técnica é esporádica, sendo os produtores praticamente os únicos responsáveis pelo manejo e alimentação dos animais.

Devido à falta de informações sobre inocuidade dos alimentos e boas práticas de armazenamento do milho, os produtores estão sujeitos a perdas econômicas, em decorrência dos transtornos ocasionados pelas micotoxicoses que incluem a redução na imunidade dos animais, perda de apetite e em alguns casos morte, reduzindo conseqüentemente os desempenhos de produção (carne, leite, ovos ou lã), de crescimento e de reprodução. Contudo, o mais instigante para pesquisa, em meio a esse cenário, é que muitas dessas perdas ocorrem sem mesmo terem suas causas diagnosticadas pelos produtores.

Além dos prejuízos econômicos proporcionados às propriedades rurais, cabe salientar que a ingestão de micotoxinas pelos animais pode deixar resíduos nos subprodutos que, ao longo da cadeia alimentar, são consumidos pelo homem. Assim, a questão tem implicações ainda mais graves do que as relacionadas às perdas econômicas, principalmente por afetar a saúde humana. Por isso, devem ser realizadas pesquisas contínuas sobre a incidência de micotoxinas em grãos e alimentos, malefícios causados, práticas de controle e prevenção, assim como, difundir tais informações às cadeias de produção e comercialização de modo a evitar a contaminação por micotoxinas.

Diante desta problemática, este trabalho avalia alternativas de armazenagem de milho, viáveis de serem utilizadas em propriedades rurais, em relação à manutenção da qualidade físico-química, incidência de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* e ocorrência de aflatoxinas. Para tanto, são avaliados dois experimentos anuais de armazenagem de milho (safra de inverno 2012 e safra de verão 2012/13), compostos por dois híbridos submetidos a quatro tipos de acondicionamentos de armazenagem.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade do milho de duas safras agrícolas (inverno 2012 e verão 2012/2013) durante a armazenagem, diagnosticando a ocorrência de aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2), a incidência fúngica (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp.) e atributos físico-químicos, ao longo de 12 meses, em dois híbridos de milho (30k73Hx e 2B668RR) submetidos a quatro tipos de acondicionamentos de armazenagem.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar alternativas de armazenagem de milho, que possam ser usadas em pequenas e médias propriedades rurais;
- b) Quantificar atributos físico-químicos (teor de água dos grãos, cinzas, proteínas, lipídios, grãos sem defeito, peso volumétrico, peso de mil grãos) da massa de grãos de milho, ao longo do tempo, nos dois experimentos de armazenagem;
- c) Diagnosticar a incidência de fungos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. na massa de grãos, ao longo do tempo, nos dois experimentos de armazenagem.
- d) Detectar a presença de aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) na massa de grãos de milho, ao longo do tempo, nos dois experimentos de armazenagem e comparar os níveis encontrados com os preconizados pela legislação.
- e) Verificar se há diferença entre os tipos de acondicionamento e tempos de armazenagem na qualidade físico-química, na incidência de fungos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., total de bolores e leveduras e na ocorrência de aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$), para cada híbrido de milho em cada experimento de armazenagem.

- f) Analisar quais das catorze variáveis aferidas neste trabalho (teor de água dos grãos, cinzas, proteínas, lipídios, grãos sem defeito, peso volumétrico, peso de mil grãos, ocorrência de aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$), contagem de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., total de bolores e leveduras, temperatura e umidade relativa do ar) são responsáveis pelas maiores variações na qualidade do milho armazenado.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O milho

O milho é uma herbácea pertencente à classe das monocotiledôneas, família *Poaceae*, tribo *Maydeae*, gênero *Zea*, cientificamente denominado *Zea mays* L. (FERRARI FILHO, 2011). É o segundo grão mais produzido no Brasil, com um volume de 78,8 milhões de toneladas na safra 2013/14. Sua importância econômica se dá pelas diversas formas de utilização, que compreendem desde a alimentação animal com o produto *in natura* até as indústrias de alta tecnologia. O país se destaca no *ranking* mundial como 3º maior produtor desse grão e o estado do Paraná possui a segunda maior produção do país, atingindo 20,3% da produção nacional (CONAB, 2014).

Os grãos são geralmente amarelos ou brancos, com peso médio entre 0,25 e 0,30 g e composição média: 72% de amido, 9,5% de proteínas, 9% de fibras e 4,3% de lipídios (FIGUEIRA *et al.*, 2003). Devido à alta porcentagem de amido e lipídeos é considerado um alimento potencialmente energético tanto para alimentação humana quanto animal. Os grãos são formados por quatro estruturas básicas: endosperma, gérmen, pericarpo (casca) e ponta, conforme representado na Figura 1.

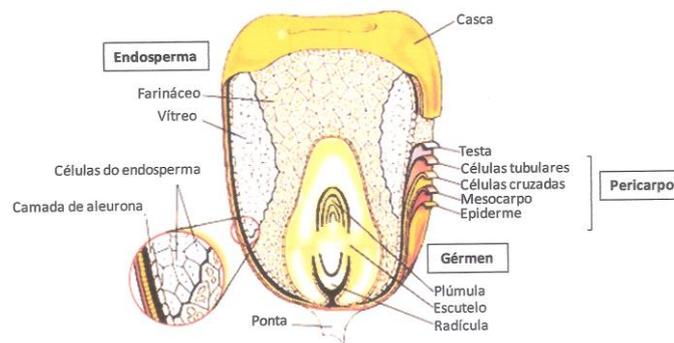


Figura 1 Anatomia do grão de milho.

Fonte: Paes (2006) adaptado por Rocha (2010).

O endosperma compreende cerca de 83% do grão, sendo composto principalmente por amido (88%). O pericarpo é responsável por proteger as demais estruturas do grão da umidade ambiente, do ataque de insetos e microrganismos, representando cerca de 5% da

semente. O gérmen representa 11% do grão, concentrando 83% dos lipídios e 78% dos minerais da estrutura da semente. A ponta ou camada preta é a menor estrutura do grão (2%), responsável pela conexão do grão com a espiga, composta basicamente por material lignocelulósico. A classificação deste cereal é realizada, segundo as características do grão, em cinco tipos: dentado, duro, farináceo, pipoca e doce. Os grãos comercializados são principalmente dos tipos duro e dentado e, em países de clima temperado, especialmente o tipo dentado (PAES, 2010).

O milho é um cereal presente na dieta alimentar humana na forma de: fubá, milho verde, milho em conserva, pipoca, farinha, amido, flocos de milho, quirera, canjica, óleo e outros derivados (MARQUES *et al.*, 2009). Na dieta animal é utilizado como o principal componente energético das rações, ocupando cerca de 70% da composição da ração (FREITAS *et al.*, 2005). De 60 a 80% da produção brasileira de milho é destinada à alimentação na cadeia pecuária nacional (NUNES, 2011).

A cultura do milho é realizada mundialmente, em diferentes regiões e sistemas de cultivo, tanto em grandes quanto pequenas propriedades, mas, apesar disso, os processos fisiológicos de maturação são iguais e os grãos precisam ficar no campo até atingir a maturidade fisiológica. A colheita mecânica é realizada com grau de umidade entre 25 e 30%, necessitando de secagem imediata para redução da umidade a níveis $\leq 13\%$ b.u. (base úmida), para viabilizar a manutenção da qualidade durante a armazenagem (PARAGINSKI, 2013). Os danos mecânicos sofridos pelos grãos, durante a colheita, geram trincas no endosperma, escarificações no pericarpo e até mesmo ruptura do endosperma, aumentando a deterioração dos grãos durante a armazenagem, pois esses danos facilitam a ação de fungos e insetos (DIAS, 2012).

Os grãos de milho são organismos vivos que respiram mesmo após a colheita, por isso, sua deterioração é um processo natural. O método de secagem empregado, a temperatura de armazenagem, o teor de água dos grãos e o ambiente de armazenagem são cruciais para acelerar ou retardar o processo de deterioração, pois podem intensificar a respiração dos grãos, facilitar as infestações por insetos e a proliferação de fungos (LEAL, 2012).

Após a colheita, os grãos comercializados são enviados às unidades armazenadoras, onde são classificados de acordo com as normas de padrões de qualidade e passam por processos de secagem e limpeza. A comercialização de grãos de milho no Brasil é realizada de acordo com os padrões de qualidade descritos na Instrução Normativa nº 60, de 22 de dezembro de 2011, publicada no Diário Oficial da União de 23/12/2011, com alterações dadas pela Instrução Normativa MAPA nº18, de 4 de julho de 2012, cujos limites

máximos de tolerância (%) para classificação estão descritos na Tabela 1 (BRASIL, 2012; BRASIL, 2009).

Estes padrões de qualidade classificam grãos avariados como grãos ou pedaços de grãos que se apresentam ardidos, fermentados, germinados, gessados, mofados, chochos ou imaturos. Grãos ardidos apresentam escurecimento total, pela ação da temperatura, teor de água, fermentação, entre outros fatores. Grãos quebrados são os pedaços que passam pela peneira de crivo 5,0 mm (cinco milímetros) de diâmetro e ficam retidos na peneira de crivo 3,0 mm (três milímetros) de diâmetro, já os pedaços que passam por essa última peneira são classificados como impurezas. As matérias estranhas são os corpos ou detritos de qualquer natureza estranhos ao produto, como grãos ou sementes de outras espécies vegetais, sujidades e insetos mortos (BRASIL, 2012).

Tabela 1 Limites máximos de tolerância (%) para classificação de grãos de milho pela Instrução Normativa nº 60/ 2011 MAPA

Enquadramento	Grãos avariados		Grãos quebrados	Matérias estranhas e impurezas	Grãos carunchados
	Ardidos	Total			
Tipo 1	1,00	6,00	3,00	1,00	2,00
Tipo 2	2,00	10,00	4,00	1,50	3,00
Tipo 3	3,00	15,00	5,00	2,00	4,00
Fora de Tipo	5,00	20,00	> 5,00	>2,00	8,00

Além da classificação física, a densidade dos grãos de milho, também denominada peso volumétrico ou massa específica, é outro parâmetro importante, comumente utilizado pelas agroindústrias como atributo de avaliação da qualidade do produto. Essa medida corresponde ao peso da massa de grãos contida em um determinado volume, geralmente expressa em kg.m^{-3} . A densidade dos grãos pode ser alterada por diversos fatores pré e pós-colheita e a sua redução está relacionada com o aumento de avarias nos grãos, ou seja, o percentual de grãos ardidos, quebrados, chochos, impurezas/fragmentos e material estranho aumentam à medida que a massa específica diminui (LEAL, 2012).

No entanto, como o milho é um dos principais produtos da agricultura familiar, nem sempre ele é enviado às unidades armazenadoras comerciais ou que usem tecnologias adequadas aos procedimentos de secagem, limpeza e armazenamento. Muitas vezes, esse cereal passa por procedimentos precários de secagem e limpeza, através de técnicas rudimentares e fica armazenado na propriedade em estruturas inadequadas à manutenção da qualidade, tanto física quanto nutricional e sanitária (PIMENTEL *et al.*, 2011).

3.2 Armazenagem de grãos

Devido às entressafras e períodos de seca os grãos de milho ficam armazenados de um ano para outro. A armazenagem é uma importante aliada entre a produção e o consumo das safras agrícolas, tendo fundamental influência socioeconômica para oferta de produtos em todas as épocas, além de ser decisiva na qualidade final dos grãos (PUZZI, 2000; FERRARI FILHO, 2011). Também possibilita a comercialização da produção ao longo de todo ano, permitindo ao produtor escolher a época adequada de venda e com isso melhores preços (SILVA, 2008).

No Brasil, 18,3% da produção de grãos é armazenada na forma convencional e 81,7% a granel. Especificamente na região sul do país, 15,2% da armazenagem é convencional e 84,8% a granel (CONAB, 2011). A forma convencional compreende armazéns convencionais construídos em concreto, alvenaria, madeira, estruturas metálicas ou mistas, nas quais a estocagem é feita em lotes de sacarias de polipropileno empilhados sob estrados com um mesmo produto agrícola. O armazenamento a granel pode ser em: armazém granelizado, armazém graneleiro, silos metálicos, silos de concreto, silos bolsa. O armazém granelizado é uma adaptação dos armazéns convencionais, para atuar com produto a granel. O armazém graneleiro, constitui-se de uma unidade armazenadora cuja estocagem a granel ocorre de forma horizontal, através de um ou mais compartimentos, com movimentação de grãos automatizada ou semi-automatizada e emprego de aeração mecânica. Os silos podem ser de concreto ou metálicos, herméticos ou semi-herméticos. Os silos bolsa consistem em grandes bolsas horizontais de polietileno, com capacidade aproximada de 180 toneladas, ficam direto no chão e possibilitam o armazenamento na própria lavoura (D'ARCE, 2011).

Das unidades armazenadoras cadastradas no Brasil 75,36% são privadas, 20,41% cooperativas e 4,23% da União. Sendo assim distribuídas: 13,63% em fazendas, 36,10% rurais, 44,03% urbanas e 6,24% portuárias (CONAB, 2011). Costa *et al.* (2010) destacam que o baixo número de unidades armazenadoras localizadas nas fazendas no Brasil, compreendem um grande problema em relação a produção de grãos, elevando o custo dos subprodutos em virtude dos grandes gastos com transportes.

Para Silva (2008), a armazenagem em fazenda tem grande importância na minimização das perdas quanti-qualitativas do pós-colheita, que compreendem, em média, 30% da produção brasileira; Contribui também na redução de custos com transporte, no melhor rendimento da colheita e na maior possibilidade de agregar preço ao produto. Segundo esse autor, desde 1975, quando foi criado o Programa Nacional de Armazenagem (PRONAZEM) disponibilizando linhas de crédito para ampliação da capacidade estática

armazenada nos diversos níveis no Brasil, o armazenamento em fazenda foi estagnado, não apresentando aumento significativo no decorrer dos anos, tanto em quantidade quanto em qualidade, sendo que em grande parte das fazendas o objetivo da armazenagem é atender a demanda de subsistência da produção pecuária.

Os sistemas de armazenagem em fazenda empregados no Brasil são variados, dependendo das condições econômicas da fazenda, envolvem tecnologias de ponta, entretanto, em algumas pequenas propriedades rurais as estruturas são precárias, sendo comum encontrar armazenagem de milho em espigas. O armazenamento em bolsas seladas hermeticamente (silos bolsa) é uma alternativa aos métodos convencionais de armazenagem em fazenda, essa técnica vem sendo estudada no Brasil (FARONI *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2012) e a cada ano que passa tende a difundir seu uso nas várias zonas agrícolas do país.

Nos acondicionamentos herméticos não ocorrem trocas gasosas entre a massa de grãos armazenada e o ambiente. O processo respiratório dos grãos, fungos e insetos associados tende a reduzir a concentração interna de oxigênio (O_2) e aumentar a concentração de dióxido de carbono (CO_2), diminuindo a capacidade de reprodução e/ou desenvolvimento de insetos e microrganismos aeróbios e deixando o metabolismo dos grãos lento, com reduzida taxa de respiração, estabilizando, assim, a degradação da massa de grãos (RUPOLLO *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2012).

Embora a armazenagem hermética ainda seja pouco utilizada no Brasil, Leños *et al.* (2007) consideram essa opção melhor em relação às tradicionais no controle de pragas, na redução de perdas físico-químicas dos grãos e na qualidade de sementes, para eles esse acondicionamento não reduz a porcentagem de grãos acometidos por fungos, mas reduz o crescimento dos mesmos.

Independentemente da forma de armazenagem empregada, a massa de grãos consiste em um sistema ecologicamente vivo que, embora esteja em estado de dormência, continua com funções metabólicas ativas, como respiração e transpiração, estando propensos a alterações químico-físicas por influências mútuas de fatores físicos, químicos e biológicos (FARONI, 1998). Se for realizado em condições apropriadas, o armazenamento evita perdas qualitativas e quantitativas ao longo do tempo, possibilitando a conservação dos grãos e de seus atributos (FARONI *et al.*, 2005).

A qualidade dos grãos de milho, durante a armazenagem, está vinculada ao processo de secagem e ao controle de pragas de armazenagem. Mohale *et al.* (2013) observam que a secagem dos grãos deve ser realizada logo após a colheita de forma eficiente, reduzindo o teor de água para menos de 13%. Para Magan *et al.* (2003), o rigoroso controle de insetos e pragas é necessário, pois além destes consumirem grande

parte da massa de grãos, são vetores na disseminação de esporos podendo iniciar ou agravar a proliferação de fungos, em decorrência das atividades metabólicas os insetos geram umidade via condensação e provocam elevação da temperatura na massa de grãos.

Segundo Paraginski (2013), apesar da qualidade, ao fim da armazenagem, estar correlacionada com a qualidade inicial dos grãos, ela sofre mútuas influências durante a armazenagem de fatores como: temperatura, umidade dos grãos, umidade relativa do ar (UR), atmosfera de armazenamento, percentual de grãos danificados, impurezas e matérias estranhas, presença de microrganismos, insetos, ácaros e do período de armazenamento.

Silva (2008) considera o grau de umidade o fator mais importante na deterioração dos grãos, durante o armazenamento, sugerindo um limite de umidade para o milho na faixa de 12-13% b.u. para o período de doze meses e, para períodos mais longos, recomenda que o grau de umidade não exceda a 11%. Segundo esse autor, níveis baixos de água reduzem a contaminação por microrganismos e a taxa de respiração dos grãos. Para Ferrari Filho (2011), um armazenamento adequado e seguro de produtos agrícolas evita perdas e preserva a qualidade dos grãos.

Como a armazenagem e o tipo de embalagem são decisivos na manutenção da qualidade de grãos e sementes, Camargo e Carvalho (2008) avaliaram diferentes tipos de embalagem (papel tipo kraft trifoliado, embalagem plástica e acondicionamento a vácuo) e ambientes (com e sem fungicida, armazenados a 8 e 11% de umidade, câmara refrigerada e convencional), na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de milho doce armazenados por 18 meses, constatando que, na câmara refrigerada, as embalagens plásticas e de papel mantêm melhor a qualidade, enquanto que no ambiente natural, isso ocorre com o acondicionamento à vácuo e as embalagens plásticas. Constataram também que a ocorrência de fungos *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus* sp., em câmara refrigerada, e *Aspergillus* sp., em armazém convencional, é beneficiada nas sementes não tratadas com fungicida em todas as embalagens.

Antonello *et al.* (2009) avaliaram a qualidade física, fisiológica e sanitária de três variedades de milho de Santa Maria - RS, armazenados em sacos de tecido (algodão) e em embalagens plásticas (garrafas PET) por seis meses em condições ambiente, verificaram que a embalagem plástica foi a que melhor manteve os parâmetros de qualidade dos grãos. Resultados correlatos foram observados por Catão *et al.* (2010), em sementes de milho de 17 variedades crioulas, armazenadas em garrafas PET por 6 meses, Estes autores verificaram alta qualidade das sementes antes e após armazenagem, obtendo valores acima do padrão mínimo exigido para a comercialização.

Dependendo das condições climáticas de cultivo e do momento da colheita, o grão traz consigo uma ampla gama de contaminantes microbianos que, associados à falta de

boas práticas durante a armazenagem e altas taxas de umidade e temperatura, propiciam o desenvolvimento fúngico (MAGAN; ALDRED, 2007; HOELTZ *et al.*, 2009).

Para Travaglia (2011), a contaminação fúngica de produtos alimentícios é um dos problemas mais preocupantes na atualidade. Em grãos de cereais pode representar um significativo perigo para a cadeia de alimentos, gerando uma série de perdas como matéria seca, poder germinativo, degradação nutricional, descoloramento, emboloramento visível, odor desagradável e, ainda, pode resultar no desenvolvimento de compostos tóxicos como as micotoxinas (HERMANNNS *et al.*, 2006; MAGAN; ALDRED, 2007).

Devido à grande utilização do milho, tanto na alimentação humana quanto animal, e sendo a armazenagem uma das etapas do pós-colheita com fundamental influência na qualidade do produto (COSTA *et al.*, 2010), faz-se necessário avaliar quais tipos de acondicionamentos possibilitam a manutenção da qualidade e a segurança alimentar deste cereal por um período maior durante a armazenagem.

3.3 Fungos

Os fungos compreendem um amplo grupo de organismos definidos como bolores, leveduras e cogumelos. Cerca de 100.000 espécies de fungos já foram descritas na literatura. Os fungos são denominados cosmopolitas por se desenvolverem em *habitats* diversos no mundo inteiro, inclusive em meio aquático, apesar de a grande maioria ser terrestre. Dentre as espécies existentes algumas são importantes decompositoras de matéria orgânica, outras fazem associações simbióticas, auxiliando plantas na absorção de minerais oriundos do solo; algumas espécies são utilizadas na elaboração de alimentos e remédios; há espécies que são parasitas de plantas, capazes de gerar inúmeros prejuízos às plantações e, ainda, há espécies patogênicas aos homens e animais (MADIGAN *et al.*, 2010).

Os fungos são organismos eucariotos pertencentes ao reino Fungi (Domínio Eucarya), e podem ser unicelulares (leveduriformes) ou multicelulares (filamentosos) (PIMENTA, 2010). Os fungos multicelulares, também denominados de bolor, são formados por uma rede de filamentos denominados hifas, que crescem, ramificam-se e formam um aglomerado entrelaçado denominado micélio, responsável por fixar o fungo ao substrato e absorver nutrientes. Nas extremidades das ramificações das hifas ficam os esporos, denominados conídios. São os órgãos reprodutores, de maneira sexual ou assexual, atuam na dispersão dos fungos através do vento, água, poeira, insetos, animais e restos vegetais

para novos locais onde possam germinar. Como são resistentes às variações de temperatura, podem ficar dormentes no solo como esclerócios por vários anos (SILVA, 2005).

Além disso, os fungos podem se desenvolver em substratos com baixo pH ou em temperaturas elevadas (até 65 °C) isso facilita a sua disseminação em alimentos, meios de cultura e todos os tipos de superfícies (MADIGAN *et al.*, 2010). A pigmentação das colônias, disposição do micélio vegetativo, morfologia e o formato dos esporos são características importantes para a identificação de gêneros e espécies (KONEMAN *et al.*, 2001).

O milho, substrato rico em amido, é um dos cereais mais vulneráveis ao desenvolvimento de fungos toxigênicos (ZUMMO; SCOTT, 1992; MARQUES *et al.*, 2009). Os principais gêneros fúngicos que acometem grãos de milho são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (DILKIN *et al.*, 2000; HERMANNNS *et al.*, 2006; LAMBONI; HELL, 2009; MARQUES *et al.*, 2009; BENTO *et al.*, 2012; DIAS, 2012; MOHALE *et al.* 2013). Esses três gêneros podem se desenvolver no milho em diferentes fases, desde o cultivo na lavoura, no transporte e na armazenagem. Os fatores que influenciam o desenvolvimento fúngico durante o armazenamento de grãos são: teor de água dos grãos, temperatura, umidade do ar, composição do grão, pH, disponibilidade de oxigênio, danos físicos do grão, condição sanitária, armazenamento anterior, linhagem do fungo e intensidade de inoculação, fatores bióticos como a presença de espécies competidoras, insetos e ácaros (SILVA, 2005; SOUZA, 2007).

Fungos filamentosos podem produzir uma grande diversidade de metabólitos secundários, como pigmentos, antibióticos, fitotoxinas além dos compostos tóxicos chamados micotoxinas (SILVA, 2008). Os fungos que invadem grãos e sementes são separados em dois grupos ecológicos, fungos de campo (endofíticos ou patógenos de plantas) e fungos de armazenamento (saprofíticos ou decompositores).

Os fungos de campo se desenvolvem ainda na lavoura, durante a maturação das plantas. Os gêneros mais incidentes são *Alternaria*, *Cephalosporium*, *Gibberella*, *Cladosporium*, *Helminthosporium*. e *Fusarium*, sendo este último o mais frequente em milho. Para crescerem, os fungos requerem umidade relativa do ar entre 70-90% e umidade dos grãos entre 20-21%. Esses fungos causam enrugamento nas sementes, fragilizam ou matam o embrião, são patogênicos às plantas e sementes (TANAKA *et al.*, 2001).

Os fungos de armazenamento se encontram nos grãos recém-colhidos em pequenas porcentagens e são capazes de se desenvolver em substratos com baixo teor de água (13-18%), baixa umidade relativa do ar (65%≥) e em temperaturas entre 10 °C e 40 °C, em sucessão aos fungos de campo. Compreendem os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor* (SCUSSEL, 2002). Os principais danos causados são: deterioração,

descoloração, perda do poder germinativo, perda de matéria seca, redução no valor nutricional, calcinação, aumento da temperatura da massa de grãos e odor desagradável, além de favorecerem o desenvolvimento de insetos-pragas e a produção de micotoxinas (FAO, 2014). Entretanto, essa separação entre fungos de campo e armazenamento não é absoluta, uma vez que algumas espécies se desenvolvem tanto na lavoura quanto no armazenamento.

Souza (2007) relata que as condições climáticas do Brasil favorecem o desenvolvimento fúngico, sendo a umidade da massa de grãos um fator decisivo e o principal fator controlado nos sistemas de armazenagem do país, dado o alto custo para refrigerar a massa e controlar a umidade relativa do ar.

Magan *et al.* (2003) e Araújo (2011) enfatizam que os danos físicos dos grãos favorecem a proliferação fúngica, pois insetos e ácaros são disseminadores e as fissuras nos grãos, provocadas pela colheita mecânica ou propriamente por insetos primários e roedores, possibilitam o ingresso e a germinação dos esporos, embora muitas vezes o grão não apresente sinais visíveis de contaminação (mofo). Para Pimentel *et al.* (2011), cerca 15% das perdas de grãos armazenados são provocadas por insetos e fungos.

Os fungos ditos toxigênicos em determinadas condições de temperatura e atividade de água produzem micotoxinas, substâncias tóxicas a homens e animais. Em cereais os gêneros toxigênicos mais incidentes são *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* e *Fusarium sp.* (KAWSHIMA; VALENTE SOARES, 2006; DILKIN *et al.*, 2000; MARQUES *et al.*, 2009; HERMANNNS *et al.*, 2006). Cada espécie fúngica possui características morfológicas próprias e necessita de condições climáticas específicas para sua reprodução e produção de metabólitos secundários tóxicos.

O fungo *Aspergillus sp.* compreende um dos gêneros mais abundantes em todo mundo, por ser capaz de se desenvolver em temperaturas de 6-55 °C, em ambientes com baixa umidade relativa do ar (UR) e atividade de água (aw), respectivamente $UR \geq 65\%$ e $aw \geq 0,71$, abrange mais de 260 espécies (REIS, 2013). Caracteriza-se macroscopicamente pelas colônias coloridas e brilhantes, com colorações em tons de verde, amarelo, cinza, marrom, preto e branco. Os conidióforos são eretos, não septados e com a presença de uma vesícula na parte apical; as fiálides podem ter origem na vesícula ou diretamente da métula e os conídios se formam em cadeias (DIAS, 2012). São economicamente importantes na produção de diversos produtos, assim como na degradação, por serem saprófitas. Algumas espécies são patógenos oportunistas, responsáveis por doenças em plantas e produtos vegetais (MONTEIRO, 2012). Dentre as espécies isoladas em milho o *A. flavus* é a mais frequente, apresentando coloração entre verde oliva e verde amarelado (DIAS, 2012). A incidência de *Aspergillus sp.* na lavoura é sobretudo observada em safras

secas e quentes, em plantas estressadas, principalmente por carência de nutrientes e deficiência hídrica, o teor de água ideal para seu desenvolvimento é 18%, entretanto, tem sido encontrado em teores inferiores a 13% (MARCONDES, 2012). As espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* em condições de estresse produzem toxinas (aflatoxinas) potencialmente maléficas a humanos e animais (BRYDEN, 2012).

Os conídios dos fungos *Penicillium*, gênero também amplamente encontrado em todo o mundo, podem ser localizados no solo, ar e vegetação em deterioração (MONTEIRO, 2012). São fungos filamentosos, apresentam crescimento rápido e pulverulento. Bastante estudados em vários ramos da ciência como área toxicológica, alimentícia e farmacêutica (PIMENTA, 2010). Algumas espécies são fitopatógenos do milho tanto na lavoura quanto na armazenagem, as colônias possuem coloração esverdeada e, às vezes, branca, incidindo principalmente de uma massa de conidióforos curtos, geralmente eretos, lisos ou levemente ásperos, mononematosos ou sinematosos com poucas fiálides, seus conídios são unicelulares. Existindo mais de mil descrições de espécies na literatura, dentre essas, algumas são produtoras de toxinas (DIAS, 2012), a principal em milho é a ocratoxina A, sobretudo produzida por *P. verrucosum* (RAMOS, 2008). Na armazenagem as condições ótimas para germinação dos esporos são temperaturas entre 21-25 °C, umidade relativa do ar entre 80-90% e teor de água dos grãos entre 15-18% (MARCONDES, 2012).

O gênero *Fusarium* caracteriza-se por apresentar crescimento rápido e compreende um dos principais patógenos primários da cultura do milho, responsável pelo apodrecimento da raiz, colmo, grãos e espigas (ROCHA, 2010), necessita de alta atividade de água (a_w), acima de 90% (SCAFF, 2003). Algumas espécies produzem fumonisinas, principalmente *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. nygamai* (POZZI *et al.*, 2002) e podem biossintetizar essas toxinas ainda na lavoura, assim como durante os processos de pós-colheita: transporte, secagem e armazenamento (SOUZA, 2007; MAZIERO; BERSOT, 2010). Minami *et al.* (2004) ressaltam não ser possível aferir visualmente grãos de milho com baixa ou alta concentração de fumonisinas. As espécies de *Fusarium* possuem diferentes preferências climáticas, existindo espécies cosmopolitas e outras de climas tropicais, quentes, áridos ou, ainda, temperados. Dentre estas, a espécie *Fusarium verticillioides* predomina em grãos de milho e tem maior incidência em climas tropicais, temperados e úmidos (ATAYDE, 2013). As colônias desta espécie apresentam 3 a 5 cm de diâmetro em 4 dias a 25 °C (SILVA, 2007b), causam descoloração nos grãos, estrias brancas no pericarpo e, em alguns casos, percebe-se um cotonoso micélio róseo sobre a espiga (RAMOS, 2008). O gênero *Fusarium* caracteriza-se macroscopicamente por colônias cuja coloração é variada (rosa, laranja, creme, vermelho escuro, púrpura, violeta e lilás). Seus esporos possuem duas principais formas: micronídios, unicelulares e uninucleados, e macroconídios multicelulares, porém

cada célula possui um único núcleo (MARTINS, 2005). A temperatura ótima de crescimento varia de 22,5 a 27,5 °C, embora existam relatos que espécies como *F. verticillioides* conseguem crescer em temperaturas entre 2,5 e 37,5 °C (SILVA, 2007b).

Além das condições climáticas e do tipo de substrato favorável, a permanência e proliferação de uma determinada espécie fúngica depende da sua taxa de germinação, taxa de crescimento, produção enzimática, capacidade de esporulação e competição com outros microrganismos presentes (MAGAN *et al.*, 2003).

3.4 Micotoxinas

As micotoxinas estão presentes em 25% de todos os produtos agrícolas mundialmente produzidos (FREIRE *et al.*, 2007). O termo micotoxina tem origem da junção do termo grego *mikes* (fungos) com o termo latino *toxicum* (veneno), significando toxina produzida por fungos (BURAGAS, 2005). Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos em cereais principalmente pelos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (HOELTZ *et al.*, 2009). Aparentemente a produção destes metabólitos, não tem relação direta com qualquer função necessária ao metabolismo destes fungos (VITORINO, 2011). Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são mais comumente encontrados em processos pós-colheita, como secagem e armazenamento (DIAS, 2012), enquanto o gênero *Fusarium* é um patógeno da planta, que produz micotoxinas ainda na lavoura ou logo após a colheita (HERMANNNS *et al.*, 2006).

Embora se conheça há séculos a capacidade de certos fungos produzirem substâncias tóxicas, somente em 1850 descobriu-se que o ergotismo estava relacionado à ingestão de centeio infectado pelo fungo *Claviceps purpurea* e, com isso, percebeu-se que a ingestão de metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos pode causar enfermidades, colocando a saúde humana e animal em risco (SANTURIO, 2000). As doenças causadas por micotoxinas a humanos e animais são denominadas micotoxicoses (AMARAL *et al.*, 2006).

Pimenta (2010) descreve que a produção de metabólitos secundários está relacionada à competição entre microrganismos, como mecanismo de defesa e adaptação ao ambiente. Esse autor cita ainda que a mudança de um meio de cultura à outro pode ocasionar aumento ou início do processo de biossíntese de metabólitos secundários, assim como pequenas alterações do tempo de incubação, temperatura, pH, gases e minerais disponíveis.

Segundo Rupollo *et al.* (2004), diferentes fungos produtores de micotoxinas se desenvolvem em todas as regiões do mundo, sob condições variadas de temperatura, umidade, pH e substratos. De maneira que já foram identificadas mais de 300 formas de micotoxinas (MINAMI *et al.*, 2004), dentre estas, a legislação brasileira estabelece níveis de tolerância em alimentos para aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂), ocratoxina A, patulina, fumonisina (B₁, B₂), desoxinivalenol (DON) e zearalenona (ANVISA, 2011).

Fungos de diferentes espécies podem ser agentes produtores de um mesmo tipo de micotoxina, assim como, uma única espécie de fungo pode produzir mais de um tipo de micotoxina (SCUSSEL, 2002). Segundo Minami *et al.* (2004), a produção de toxina e o grau de contaminação dos alimentos dependem do tipo de alimento, da composição e textura, de fatores ambientais, da umidade e temperatura.

Bittencourt *et al.* (2005) colocam a temperatura e a umidade relativa do ar como os principais fatores que contribuem na produção de micotoxinas. Moreno (2008) relata a possibilidade da presença de vários compostos tóxicos em um mesmo alimento (substrato), isto é, a co-ocorrência de micotoxinas, cujas interações e seus efeitos são ainda cientificamente desconhecidos.

A classificação das micotoxinas é realizada de acordo com a espécie fúngica produtora, estrutura química, toxicidade e modo de ação. São metabólitos secundários por serem produzidos durante a fase final do crescimento exponencial dos fungos, não estando ligadas aos mecanismos essenciais do seu desenvolvimento, os metabólitos primários (POZZI, 2002).

De maneira geral, as micotoxinas apresentam grande estabilidade química, pois a remoção dos fungos de um alimento, através dos processos de industrialização, não garante que o alimento esteja isento da contaminação por micotoxinas, isso porque elas são termorresistentes e não se degradam facilmente (BURAGAS, 2005).

Por outro lado, a presença do fungo toxigênico no alimento (grão) não implica necessariamente a presença de micotoxinas, pois a produção destas está diretamente relacionada à capacidade de biossíntese do fungo em consonância com determinadas condições de temperatura, umidade, pH e composição do substrato (SCUSSEL, 2002; MAZIERO; BERSOT, 2010; STEFANELLO *et al.*, 2012). Entretanto, para Bernd (2006), em condições favoráveis poucas horas são suficientes para a produção de toxinas. VEIT (2013) enfatiza que a presença de fungos com potencial toxigênico nos alimentos indica potencial risco de contaminação.

A contaminação humana por micotoxinas pode ocorrer de forma direta ou indireta. Direta pela ingestão de alimentos vegetais contaminados e, em menor frequência, pela inalação ou absorção pela pele (HAYASHI, 2007; VEIT, 2013). Indireta pela

biotransformação, isto é, pelo consumo de subprodutos de animais (leite, carne, ovos) que ingeriram micotoxinas no consumo de ração, silagem entre outros alimentos contaminados. O efeito na saúde humana e/ou animal varia com o tipo e a toxicidade da micotoxina ingerida, quantidade total, frequência de consumo, presença de outros compostos tóxicos e/ou químicos, estado nutricional do indivíduo, peso corporal, raça, sexo e idade (ZAIN, 2011).

Além do grande risco à saúde humana as micotoxinas se tornaram um problema mundial na produção de grãos e alimentos (ZAIN, 2011), não somente para países em desenvolvimento como o Brasil, mas para toda cadeia do agronegócio, causando transtornos às exportações e, em alguns níveis de contaminação, até mesmo o seu impedimento (LEUNG *et al.*, 2006). Vitorino (2011) enfatiza que as micotoxinas são frequentemente detectadas em rações para animais e ou em cereais, elementos fundamentais na sua elaboração, tornando-se um grave problema nas atividades pecuárias, atingindo a qualidade sanitária e propiciando perdas econômicas.

Segundo Freire *et al.* (2007), estudos realizados no Brasil encontraram níveis de contaminação por micotoxinas em alimentos que são bases para rações animais, muito superiores aos permitidos tanto pela legislação brasileira quanto internacional. Os autores salientam que devido à grande extensão territorial do Brasil, existem dificuldades de controlar e auditar a qualidade dos produtos, segundo o que prevê a legislação. Assinalam, também, que existe uma escassez de informações no meio produtivo, sendo necessária a realização de um maior número de pesquisas e programas de difusão de informações sobre boas práticas nos processos, tanto o de produção quanto os de pós-colheita.

A Resolução nº 7 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de 18 de fevereiro de 2011, dispõe sobre os limites máximos a serem tolerados (LMT) para as micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxina, fumonisinas, zearalenona) no milho em grão e em seus subprodutos no Brasil. Sendo o máximo aceitável $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a soma das aflatoxinas $B_1+B_2+G_1+G_2$, $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a ocratoxina A, $2500 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a soma das fumonisinas B_1+B_2 e $300 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a zearalenona (ANVISA, 2011). Até 2011, a legislação brasileira só previa limites máximos de tolerância para as aflatoxinas, a Resolução que vigorava era de 2002.

Para Araújo (2011), a ocorrência de micotoxinas na cadeia de alimentos é inevitável, sendo influenciada por uma série de fatores, conforme retratado na Figura 2, sendo a temperatura e a umidade destacadas por Paterson e Lima (2010) como cruciais no desenvolvimento fúngico e na produção de micotoxinas. Cabe salientar que a produção destes metabólitos tóxicos pode iniciar ainda na lavoura e, quando não detectadas e não

controladas nas diversas etapas do ciclo, prosseguem na cadeia alimentar até serem ingeridas pelos humanos, tanto em via direta como indireta.

Para Bernd (2006), a produção de micotoxinas nos grãos pode iniciar na lavoura, estando relacionada às condições climáticas tanto por estresse hídrico provocado por estiagem quanto por altos índices de pluviosidade, infestação por plantas invasoras, densidade de plantio, rotação de cultura, características de fertilidade do solo, microbiota presente no solo e na vegetação de entorno, tempo entre a maturação fisiológica e a colheita. Na armazenagem, está relacionada à carga de esporos em meio à massa de grãos vindos da lavoura, à mistura de cargas e lotes, longas filas para a secagem, secagem incompleta, mistura de restos de grãos contaminados em correias e moegas, presença de poeira e impurezas, grãos danificados, infiltração de água nos silos e armazéns graneleiros, condições inadequadas de armazenagem, ausência de controle do teor de água dos grãos e do desenvolvimento de insetos-praga.

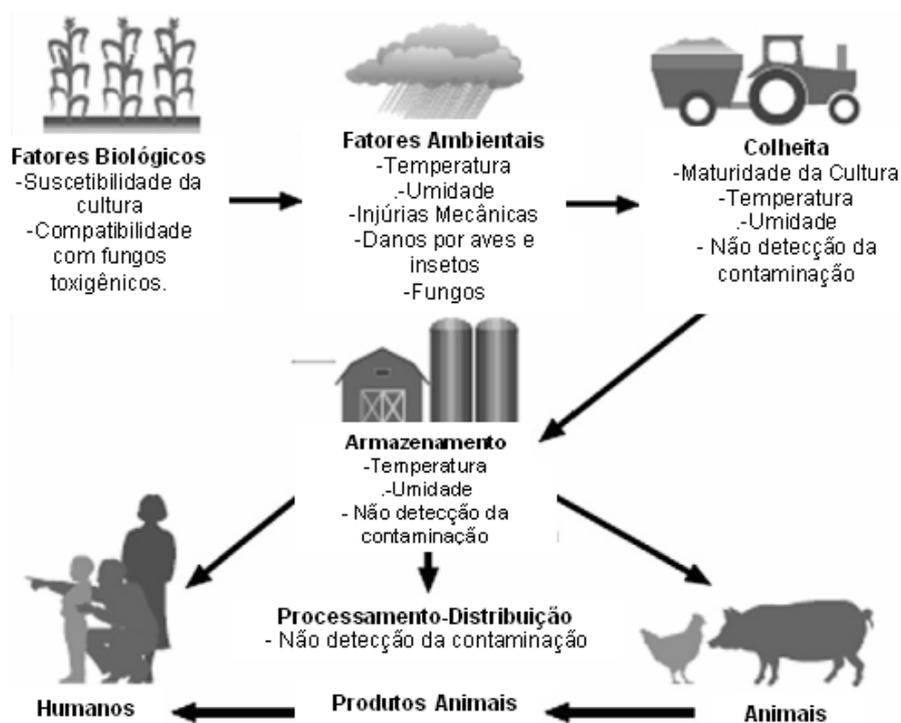


Figura 2 Fatores que afetam a ocorrência de micotoxinas na cadeia de alimentos.

Fonte: Paterson e Lima (2010).

Segundo Maziero e Bersot (2010), os produtos de origem animal como carne, ovos, leite e queijos compreendem uma fonte indireta de contaminação humana por micotoxinas. As micotoxinas se tornaram um sério problema em termos de segurança dos alimentos, pois podem provocar danos sérios tanto à saúde humana quanto animal, além de prejuízos econômicos na agropecuária (AMARAL *et al.*, 2006).

Ferrari Filho (2011) avaliou a qualidade físico-química, microbiológica e a presença de micotoxinas em grãos de milho, desde o cultivo até nove meses de armazenamento, considerando diferentes tratamentos de secagem. Concluiu que as maiores perdas ocorreram a partir dos seis meses de armazenagem e o extrato etéreo foi o componente físico-químico que mais degradou durante a armazenagem. Além disso, os fungos *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. predominaram tanto na pré quanto no pós-colheita. Observou que a contaminação dos grãos com fumonisinas e tricotecenos ocorreu ainda no campo e prevaleceu durante todo o armazenamento, enquanto a produção de aflatoxinas começou no armazenamento.

Para minimizar a contaminação da cultura do milho por *Fusarium* sp. Silva (2005) recomenda reduzir o estresse da planta, através do cultivo de variedades recomendadas ao tipo de solo e clima, baixa densidade de plantas, rotação de culturas, com manejo sob recomendações técnicas e controle de pragas por meio de inseticidas e fungicidas.

Magan e Aldred (2007) enfatizam que a prevenção da contaminação do milho por micotoxinas durante o pós-colheita (secagem e armazenamento), está relacionada à execução de algumas estratégias ao longo do plantio e manejo da cultura, como a escolha adequada dos híbridos a serem plantados, plantio em época recomendada, atendimento das recomendações técnicas de espaçamento entre as plantas, evitando grandes densidades, fertilização do solo balanceada, controle de insetos e pragas com destaque para as brocas do milho, realização da colheita, assim que as plantas atinjam a maturação fisiológica, não permitindo que os grãos secos fiquem na lavoura por longo período, expostos à propagação de esporos e ao desenvolvimento fúngico. Para a colheita, recomenda-se uma boa regulação da colheitadeira, possibilitando menor percentual de danos mecânicos aos grãos; além da adoção de medidas estratégicas no pós-colheita, dentre estas, a redução do tempo entre colheita e a secagem dos grãos, limpeza dos grãos prévia ao armazenamento, secagem rápida e eficiente a níveis inferiores a 14% de umidade, rígido controle de pragas no armazenamento, medidas sanitárias nos silos e no manejo da massa de grãos.

Já vêm sendo testadas várias substâncias com propriedades que inibem o desenvolvimento fúngico, como o ácido propiônico, acético, sórbico, benzóico, sais de cálcio, sódio, potássio, além de métodos de detoxicação, para a remoção das toxinas, por meio de solventes polares, substâncias químicas e microrganismos, e a remoção de grãos danificados e ardidos. Como o custo de aplicação em tais procedimentos é muito alto, muitas vezes, estes se tornam inviáveis. Nesse contexto, a melhor forma de reduzir a contaminação por micotoxinas é prevenindo o crescimento fúngico através do plantio de variedades resistentes, com a minimização do tempo entre a colheita e a secagem e o

armazenamento, conforme recomendações técnicas, utilizando as boas práticas de armazenagem (BURAGAS, 2005).

Para Queiroz *et al.* (2009), as boas práticas de armazenagem buscam assegurar a qualidade dos alimentos, agregando maior valor de mercado, através do manejo adequado da massa de grãos armazenada, monitoramento e combate dos contaminantes de armazenagem (roedores, insetos, fungos e micotoxinas), em todas as etapas do pós-colheita. Sendo importante evitar a mistura de lotes de milho de diferentes períodos de colheita, usar inseticidas como medida preventiva ao ataque de insetos e como medida curativa os fumigantes, realizar o controle químico e/ou por iscas para os roedores. Para Lorini (2001), a principal medida preventiva é a higienização do local de armazenagem, através da retirada de pó, impurezas, matérias estranhas e outros contaminantes, tanto previamente a estocagem quanto periodicamente durante a mesma.

Dentre as principais micotoxinas (aflatoxinas, fumonisinas e ocratoxina), produzidas pelos gêneros fúngicos mais incidentes em grãos de milho: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, tanto na pré como no pós-colheita, as aflatoxinas despertam grande interesse nas pesquisas pela capacidade tóxica e carcinogênica (ARAÚJO, 2011).

3.5 Aflatoxinas

As aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ e M₂) são toxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus sp.*, principalmente pelas espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (ARAÚJO, 2011). *A. flavus* produz apenas aflatoxinas do grupo B, enquanto *A. parasiticus* e *A. nomius* produzem aflatoxinas dos grupos B e G (AMARAL *et al.*, 2006). O nome aflatoxina tem origem no principal fungo produtor **A** de *Aspergillus*, **fla** de *flavus*, seguido do sufixo **toxinas** (BURAGAS, 2005).

As aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) podem ser encontradas em uma diversidade de alimentos, por serem contaminantes naturais de produtos agrícolas, especialmente cereais como: arroz, trigo, centeio, cevada, milho, soja, feijão, amendoim, linhaça e subprodutos destes e, ainda, em castanhas, nozes, pistache, avelãs, frutas secas entre outros (CALDAS; SILVA; OLIVEIRA, 2002; HOELTZ *et al.*, 2009; STELATO *et al.*, 2010). São conhecidas pelos efeitos hepatotóxicos, carcinogênicos, teratogênicos, mutagênicos, imunossupressores e neoplásicos que causam a humanos e animais (SAKATA *et al.*, 2011).

A denominação B₁ e B₂ vem da fluorescência azul (inglês *blue*) e G₁ e G₂ da fluorescência verde (inglês *green*) em luz ultra violeta (SOUZA, 2007). As estruturas

altamente conjugadas e rígidas das aflatoxinas ocasionam fluorescência natural, e as poucas variações entre os compostos são responsáveis pelas diferenças na fluorescência, sendo que os derivados B₂ e G₂ são mais fluorescentes que seus homólogos insaturados B₁ e G₁ (JAIMEZ *et al.*, 2000).

Dentre as aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) a B₁ é a mais incidente do grupo nos alimentos e possui maior toxicidade, seguida em ordem decrescente por B₁ > G₁ > B₂ > G₂ com a proporção de toxicidade 50, 20 e 10% em relação a B₁ (DILKIN *et al.*, 2000). As aflatoxinas M₁ e M₂ são encontradas em leite (leite fluído, leite em pó, queijo e outros derivados), carne e fezes de animais, que ingeriram rações contaminadas por B₁ e B₂, isto é, são derivadas dessas toxinas e não contaminantes naturais (ARAÚJO, 2011).

Essas toxinas apresentam grande importância devido à grande incidência em alimentos e à sua severidade tóxica (AMARAL *et al.*, 2006), sendo a aflatoxina B₁ classificada no grupo 1 dos carcinógenos humanos pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 1993). Nas produções pecuárias, afetam o crescimento dos animais, o ganho de peso, a reprodução, a capacidade produtiva, e ainda, podem ser letais causando a perda de animais. Em perus, patos e frangos provocam danos no fígado, na bile, no trato intestinal, nos rins, hemorragias; em animais mamíferos causam tumor no fígado (FREIRE *et al.*, 2007).

As aflatoxinas podem intoxicar gradualmente os humanos, apresentando efeitos no decorrer de anos, entretanto, dependendo da concentração, frequência de ingestão, estado nutricional e idade do indivíduo podem levar a óbito em 72 horas (ARAÚJO, 2011). Os sinais clínicos podem se relacionar a cirrose, necrose do fígado, encefalopatia e aumento da suscetibilidade à hepatite B (SAKATA *et al.*, 2011). As aflatoxinas afetam ainda a síntese proteica, dada a sua aptidão de ligação ao DNA das células, além de colaborarem para o desenvolvimento da aplasia tímica, também denominada Síndrome de Di George, que provoca ausência congênita do timo e das paratireóides, afetando a imunidade celular (CRUZ, 2010).

A doença provocada pela ingestão de aflatoxinas é denominada aflatoxicose e dependendo dos sinais clínicos é classificada como aguda, subaguda ou crônica em humanos e animais (ROCHA, 2010). Quando aguda, os sinais clínicos podem iniciar 6 meses após a ingestão, abrangendo severa depressão, anorexia, icterícia, sangue em meio as fezes, tremores musculares, descoordenação motora, convulsões e hipertemia. Nas intoxicações subagudas, a degradação do quadro clínico é mais lenta com falta de apetite, desânimo e depressão, os animais apresentam aspectos icterícos com progressiva perda de peso. Na intoxicação crônica ocorre perda de apetite, diarreias, má aparência, redução na produção de ovos, de leite, no ganho de peso e na conversão alimentar (ARAÚJO, 2011).

Embora já tenham sido isolados mais de 20 tipos de aflatoxinas, em contaminação natural as toxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ são as mais incidentes. A estrutura química destas é muito similar, por serem compostos químicos simples e de baixo peso molecular, todas apresentam um núcleo central cumarina ligado a uma estrutura bi-furanóide, conforme Figura 3. As aflatoxinas B possuem anel ciclopentona na molécula, enquanto as da série G possuem anel lactona (SOUZA, 2007), já as do grupo M são derivados hidroxilados de B₁ e B₂ (ARAÚJO, 2011).

O fungo *Aspergillus sp.* tem como inóculo primário o solo e, embora se desenvolva ao longo de todo ano, sua incidência é maior nos meses em que a temperatura e a umidade do ar são mais elevadas, com UR em torno de 80% e temperatura de 27 °C, sendo capaz de sobreviver na forma de esclerócio, estrutura compacta de micélio associada à resistência do fungo, por vários anos. Além disso, é produtor de aflatoxinas durante sua fase de esporulação (BURAGAS, 2005).

Para Dilkin *et al.* (2000), o desenvolvimento do gênero *Aspergillus* com produção de aflatoxinas em grãos armazenados tem como condições ótimas a umidade relativa do ar de 80-85%, a temperatura ambiente entre 24-35 °C e a umidade dos grãos em torno de 17%. Hayashi (2007) corrobora essas informações, indicando que as aflatoxinas são produzidas quando os agentes produtores estão sob condições de estresse, com temperatura diária de 25 a 30 °C, à noite 10 °C e alta UR de armazenagem 70-90%.

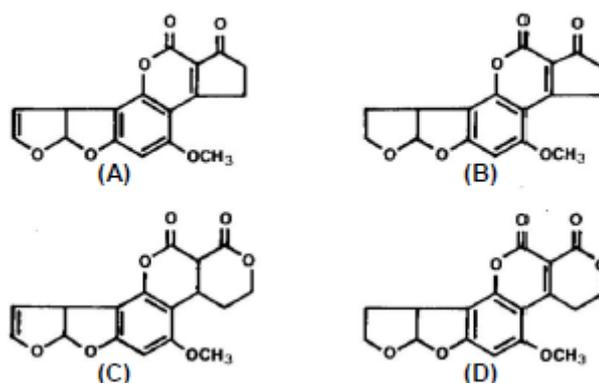


Figura 3 Estrutura química das Aflatoxinas (A) B₁, (B) B₂, (C) G₁ e (D) G₂.

Fonte: Hussein e Brasel (2001).

As aflatoxinas são compostos de natureza cristalina, solúveis em solventes polares (acetonitrila, clorofórmio, metanol, dimetilsulfóxido e água) e completamente insolúveis em solventes apolares, termorresistentes, cuja inativação só pode ser atingida em temperaturas

entre 237 °C e 306 °C, dependendo do tempo de exposição ao calor. Podendo ser mutáveis na presença de agentes oxidantes e em condições extremas de pH (HAYASHI, 2007).

As aflatoxinas são altamente estáveis em diferentes meios bióticos e abióticos (ARAÚJO, 2011). Podem ser destruídas em soluções alcalinas fortes como amônia e hipoclorito, porém não existe um método totalmente eficaz que possa ser utilizado em todos os produtos, a aplicabilidade depende do tipo de alimento a ser descontaminado, grau de contaminação e tipo de aflatoxina presente (SOUZA, 2007).

Travaglia (2011), em sua pesquisa sobre o crescimento do fungo *Aspergillus flavus* e produção de aflatoxinas em meio de cultura *Yeast Extract Sucrose (YES)* e em grãos de milho armazenados durante 14 dias, em ambiente com UR de 90%, nas temperaturas 3, 10, 15, 20, 25, 30 e 42 °C, concluiu que tanto no meio *YES* quanto nos grãos o fungo é capaz de se desenvolver em diferentes temperaturas: 15 a 42 °C no meio *YES* e 20 a 30 °C nos grãos, com produção máxima em 30 °C.

Segundo Oliveira *et al.* (2010), a contínua ingestão de aflatoxinas (AFB₁) 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, é um problema de saúde pública, pois a ingestão humana de micotoxinas pode gerar uma série de danos à saúde.

3.6 Ocorrência de aflatoxinas em milho e derivados

A qualidade dos produtos e a inocuidade dos alimentos, inclusive dos grãos vem-se tornando uma grande exigência do mercado consumidor, desse modo, a problemática suscitada pelas aflatoxinas tende a instigar preocupação do sistema produtivo, das práticas de pós-colheita, dos pecuaristas e comercializadores de grãos, pois embora as contaminações fúngicas e a ocorrência de micotoxinas sejam inevitáveis (HAYASHI, 2007) estas precisam ser reduzidas. Neste cenário surgem inúmeras pesquisas detectando a ocorrência de aflatoxinas em milho e seus derivados.

Santurio (2000) relata contaminação por aflatoxinas em 41,9% das 15600 amostras de milho analisadas pelo LAMIC (Laboratório de Análises Micotoxicológicas) da Universidade Federal de Santa Maria entre os anos 1986 e 2000, com contaminação média de 22 µg kg⁻¹.

Caldas, Silva e Oliveira (2002) analisaram a contaminação por aflatoxinas em 366 amostras de alimentos consumidos no Distrito Federal, no período de julho de 1998 a dezembro de 2001. Dentre os alimentos avaliados, predominaram amendoim (cru, torrado, creme, confeitado e doce), castanhas (de caju, do Pará, nozes, avelã, nozes e pistache), milho (grão, pipoca e canjica) e farinhas (trigo e aveia). As análises foram realizadas por CCD (cromatografia em camada delgada) e constataram que o milho em grão foi o produto com maior incidência de contaminação, cerca de 60% das amostras analisadas, seguido pelos doces de amendoim cerca de 50%, castanhas do Pará 33,3% e milho pipoca 13,6%.

Kawashima e Valente Soares (2006) pesquisaram a presença de fumonisinas B₁, aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂), ocratoxina A e zearalenona em 74 amostras de produtos derivados de milho do comércio de Recife entre 1999 e 2001. Detectaram a fumonisina B₁ em 71 amostras (20 a 8600 µg kg⁻¹), a aflatoxina B₁ em 5 amostras (máximo 20 µg kg⁻¹) e a aflatoxina B₂ em 3 amostras (máximo 3 µg kg⁻¹). Enquanto as aflatoxinas G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona não foram detectadas.

Amaral *et al.* (2006), com o objetivo de comparar dois métodos analíticos na detecção de aflatoxinas, analisaram 123 amostras de produtos alimentícios à base de milho: fubá, canjica, flocos, polenta pré-cozida, quirera, pipoca, sucrilhos, corn flakes, pipoca açucarada e salgadinho de milho, comercializados na região de Maringá e Marialva, Estado do Paraná, entre abril de 2003 e março de 2004. Encontrando 16 amostras contaminadas por aflatoxinas, segundo o método imunoenzimático (ELISA) e 7 segundo o método CCD (cromatografia em camada delgada) com respectivas médias de contaminação 0,78 e 0,62 µg kg⁻¹.

Saleemullah *et al.* (2006) determinaram o conteúdo de aflatoxinas em amostras de cereais (trigo, arroz e milho) e amêndoas (amendoim, castanhas, nozes) coletadas na Fronteira Noroeste do Paquistão entre 2000-2002. Posteriormente, inocularam amostras com *Aspergillus flavus* e armazenaram por 18 meses, visando comparar a composição química das amostras controle com as inoculadas. Realizaram duas avaliações durante o período de armazenagem uma entre 2-3 meses e outra 12-18 meses. Constataram aumento da toxina com o tempo de armazenagem em todas as amostras (inoculadas ou não). No milho, a variação média de aflatoxinas nos períodos em análise foi de 45,7 a 50,2 µg kg⁻¹.

Oliveira *et al.* (2006) avaliaram a ocorrência de aflatoxinas em 25 amostras de rações coletadas em propriedades leiteiras da Região de São Carlos-SP, encontrando contaminação em 76% das amostras, em níveis de 0,05 a 24,12 µg kg⁻¹. A toxina mais incidente foi a B₁ seguida da G₁, G₂ e B₂ encontradas respectivamente em 16, 15, 8 e 6 amostras.

Moreno (2008), avaliando a microbiota fúngica e a co-ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em 300 amostras de milho recém-colhido (safras 2003 e 2004), coletadas em três pontos da cadeia (campo, recepção e pré-secagem) na região norte do Paraná, detectou aflatoxinas em 12% das amostras da safra 2003, em níveis de 5 à 56 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e fumonisinas em 100% das amostras. Já na safra 2004, aflatoxinas foram detectadas em apenas 4% das amostras, com níveis de 12 a 52 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e fumonisinas em 97%. De modo que, apenas 8% das amostras entre ambas as safras estavam simultaneamente contaminadas com as duas toxinas.

Ramos *et al.* (2008) avaliaram a ocorrência natural de aflatoxinas em grãos de milho de 12 híbridos, cultivados em três regiões de Goiás. Os resultados de contaminação foram correlacionados com os dados de temperatura e precipitação nas regiões, presença de fungos e grãos ardidos nas amostras. Foi constatada a elevada incidência de *Aspergillus* sp. e a ocorrência de aflatoxinas na região com maior índice pluviométrico durante a colheita, embora não tenha sido encontrada correlação significativa entre a incidência deste fungo e a produção da toxina.

Santos (2008) avaliou a incidência fúngica e a ocorrência de aflatoxinas em 112 amostras de farinha de milho flocada e pré-cozida, comercializada em diferentes localidades do Estado da Bahia entre junho de 2007 e junho de 2008, encontrando fungos toxígenos em 32% das amostras, destes 50% eram fungos de armazenamento, 31% de campo e 17% ambos. No total, 16 amostras (14%) estavam contaminadas por aflatoxinas e destas, 6 (5% do total) estavam com concentração acima do limite permitido pela legislação (20 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Marques *et al.* (2009) avaliaram a incidência dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* e a ocorrência de aflatoxinas e zearalenona em cinco híbridos comerciais de milho cultivados em Astorga – PR em função da umidade de colheita. Constataram que quanto maior a umidade dos grãos durante a colheita maior a incidência de *Fusarium* e menores as incidências de *Aspergillus* e *Penicillium*. Não encontraram traços de contaminação por zearalenona, mas observaram que a produção de aflatoxinas pode ocorrer ainda na lavoura e concluíram que a antecipação da colheita, com imediata secagem melhora a qualidade sanitária dos grãos.

Cruz (2010), ao analisar 72 amostras compostas por: fubá, farinha de milho e milho em grão a ser utilizado na fabricação de rações para animais de companhia, coletadas nos municípios de Pirassununga, Porto Ferreira, Leme e Araras, Estado de São Paulo, constatou por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que apenas 4,2% (uma amostra de milho em grão) apresentaram níveis de contaminação por aflatoxinas acima do preconizado pela legislação brasileira (20 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e 65,3% (47 amostras) apresentaram

níveis de contaminação por fumonisinas acima de $30 \mu\text{g kg}^{-1}$, sendo que 100% das amostras de milho em grão apresentaram-se contaminadas pela FB1.

Rocha (2010), analisando a ocorrência natural de aflatoxinas e fumonisinas em 200 amostras de milho recém-colhido de quatro regiões do Brasil (São Paulo, Mato Grosso, Rio Grande do Sul e Bahia), encontrou contaminação por aflatoxinas em 21 amostras, sendo que 10,5% estavam contaminadas por B₁, 3,5% por B₂, 0,5% por G1 e 0,5% por G2.

A incidência de fungos e a contaminação por aflatoxina B₁ e ocratoxina A foi avaliada por Shah *et al.* (2010) em 36 amostras de grãos de milho de 6 locais do Vale Swat e da Fronteira Noroeste da Província do Paquistão. Embora os grãos estivessem armazenados com teor de água $\leq 15\%$, foi verificada a incidência dos gêneros fúngicos *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Rizophus*, com a predominância da espécie *A. flavus*. Os níveis de aflatoxina B₁ foram de não detectável a $30,92 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Eckert (2011), em seu estudo dos derivados de milho mais consumidos no município de Cascavel – PR, analisou 12 amostras dos três derivados mais consumidos no município (fubá, pipoca e amido de milho). Após as análises por CLAE, verificou a presença da aflatoxinas (B₁) em apenas uma das amostras (amido), com concentração de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$, embora a concentração encontrada tenha ficado abaixo do LMT pela legislação vigente, a autora considera pelo índice de ingestão diária provável média (IDPM) que essa contaminação representa um risco para crianças com baixo peso corporal.

Bento *et al.* (2012) verificaram a ocorrência de fungos e aflatoxinas em 84 amostras de grãos milho, procedentes das safras 2009 e 2010, armazenadas por até 30 dias em diferentes municípios do Estado do Mato Grosso. Estes identificaram a presença dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Nigrospora*, *Epicocum*, *Rhizopus*, *Cercospora* e *Curvularia* nas amostras, constatando a ocorrência de aflatoxinas em 19,04% das amostras da safra 2009 e 23,80% da safra 2010, com níveis de $1-108,7 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Leal (2012) relacionou a contaminação por aflatoxinas com o peso volumétrico (densidade) dos grãos, verificando que quanto menor a densidade dos grãos de milho maior a contaminação por aflatoxinas, ou seja, quanto maior a densidade maior a qualidade dos grãos. Encontrando $41,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ de aflatoxinas em grãos de milho com densidade $< 650 (\text{kg m}^{-3})$ e, em contra partida, $5,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para densidade $> 650 (\text{kg m}^{-3})$.

Soleimany, Jinap e Abas (2012) avaliaram a contaminação por micotoxinas em 100 amostras de cereais, 50 de arroz, 20 de trigo, 10 cevada, 10 aveia e 10 de farinha de milho comercializados na Malásia encontrando aflatoxinas em 70% das amostras, especificamente em 80% das amostras de farinha de milho com níveis de $0,15-1,8 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Motta (2012), avaliando o perfil da microbiota fúngica e a ocorrência de aflatoxinas B₁ em rações de bovinos leiteiros de nove fazendas do Estado de São Paulo, obteve leveduras

em todas as amostras e, respectivamente, *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. em 20,09, 14,16 e 11,42% das amostras. A presença de aflatoxina B₁ foi constatada em 31,44% das amostras em níveis de 1,68 a 194,51 µg kg⁻¹. Dentre as nove fazendas avaliadas em apenas uma não foi detectada a presença de aflatoxina B₁, enquanto, em outra, detectou-se contaminação por aflatoxina B₁ em 80% das amostras.

Mohale *et al.* (2013) avaliaram a presença de fungos com potencial toxigênico e a contaminação por micotoxinas em amostras de milho armazenado, de cinco regiões do Lesotho, durante as safras 2009/2010 e 2010/2011, diagnosticando a presença de *A. flavus*, *A. Parasiticus* e níveis de contaminação por aflatoxina de até 20 mg kg⁻¹, sendo que todas as amostras analisadas apresentavam aw < 0,70.

Mulunda *et al.* (2013), avaliando a ocorrência de micotoxinas em 40 amostras de grãos de milho de mercados de Lubumbashi, República Democrática do Congo, encontrou contaminação por aflatoxinas em 38 (95%) amostras cujos níveis de ocorrência variaram de 3,1 a 439,2 µg kg⁻¹.

3.7 Relatos de aflatoxicoses e implicações na produção pecuária

As doenças provocada no homem ou em animais por micotoxinas é chamada micotoxicose (SANTOS, 2008), cuja severidade varia com a toxicidade da micotoxina, grau de exposição, dose ingerida, frequência de ingestão, espécie animal, estado nutricional, sexo, idade, entre outros. Apesar das micotoxicoses não serem contagiosas, por não haver transmissão de um indivíduo a outro, um mesmo indivíduo pode contrair em seu metabolismo simultaneamente duas ou mais micotoxicoses, fato que aumenta significativamente os malefícios à sua saúde (SOUZA, 2007).

As micotoxicoses se destacaram mundialmente em 1960 com a doença “X” dos perus (AMARAL *et al.*, 2006). Essa doença se difundiu 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 muitos estudos, verificou-se que as aves morriam por necrose hepática, ocasionada pela ingestão de quantidades significativas de aflatoxina B₁, presente na ração fornecida aos animais, cujo ingrediente contaminante era a torta de amendoim importada do Brasil (CALDAS *et al.*, 2008).

As aflatoxicoses estão relacionadas à ingestão de alimentos contaminados por aflatoxinas, inalação ou contato com a toxina, pelo manuseio periódico de produtos

contaminados (SOUZA, 2007). Dentre as micotoxinas já estudadas, as aflatoxinas ocasionam os maiores impactos no desempenho produtivo e reprodutivo de aves, pois o seu trato gastrointestinal absorve rapidamente as aflatoxinas contidas nas rações e as primeiras alterações são: aumento do fígado, baço e rins e a redução da bursa e do timo, além de mudanças na coloração dos órgãos. Em surtos, é possível visualizar palidez das mucosas e pernas, além de partículas de ração mal digerida na excreta das aves com aumento na secreção de lipídios, devido à baixa absorção provocada pelo mau funcionamento do pâncreas. Estes sintomas implicam prejuízos na conversão alimentar. Nos frangos de corte causam redução no ganho de peso, principalmente nos primeiros 21 dias de vida. Enquanto nas aves de postura, causam redução na produção de ovos e respectiva diminuição no seu tamanho físico e condição nutricional (SANTURIO, 2000).

Como os efeitos causados pelas aflatoxinas nas aves podem variar com a concentração ingerida e com o nível de stress em que estas se encontram, Pereira (2009) analisou o desempenho de 1080 frangos de corte submetidos a quatro tipos de dietas: milho de alta densidade, milho de alta densidade contaminado com 2,8 ppm de aflatoxinas, milho de baixa densidade e milho de baixa densidade contaminado com 2,8 ppm de aflatoxinas. O pesquisador constatou que os frangos que ingeriram aflatoxinas e milho de baixa densidade tiveram menor desempenho em termos de ganho de peso e conversão alimentar.

Um surto de aflatoxicose ocorrido em uma granja de suínos em Sentinela do Sul - RS, em outubro de 2004, causou 2 abortos e levou a óbito 7 porcas e 8 leitões. Foi diagnosticado que o milho utilizado para o arraçoamento dos animais foi o causador do surto, pois estava amplamente contaminado com aflatoxinas, 3140 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de B₁, 195 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de B₂, 585 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de G₁ e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de G₂. O milho havia sido produzido e armazenado na propriedade (ZLOTOWSKI *et al.*, 2004).

Na meta-análise realizada por Andreatta (2011), sobre as interações das micotoxinas na alimentação de suínos e frangos de corte, a pesquisadora concluiu que, quando submetidos à alimentação com rações contaminadas, os suínos apresentaram redução no consumo e no ganho de peso de 18 e 21%, respectivamente, do mesmo modo os frangos de corte de 12 e 14%; que as micotoxinas de maior impacto no desempenho, índice produtivo e crescimento de órgãos dos suínos são a desoxinivalenol e as aflatoxinas; das aves as ocratoxinas e aflatoxinas, tendo estas micotoxinas maior efeito sobre animais jovens e, sobretudo, machos.

Pierezan *et al.* (2010) relatam um surto de aflatoxicose em bezerros de raça leiteira no Rio Grande do Sul, onde vieram a óbito 6 bezerros com cerca de 4 meses de idade e 100 kg, alimentados por feno de alfafa, milho quebrado e um substituto de leite. Pelos sinais clínicos e necropsia, constataram que a causa das mortes era aflatoxicose. Após avaliar os

alimentos ingeridos, através de cromatografia em camada delgada foi detectada a contaminação do milho consumido por aflatoxina B₁, na concentração de 5136 µg kg⁻¹. Embora a toxicidade das aflatoxinas seja variável entre as espécies animais e os ruminantes sejam mais resistentes que os monogástricos, o alto nível de contaminação por aflatoxina B₁ ocasionou o surto.

Diagnosticou-se que a morte e a perda de apetite em patos na University Poultry and Duck Farm de Kerala na Índia em 2011, foi provocada por aflatoxicose, embora sejam raros os casos reportados em patos, os sinais clínicos revelaram fígado pálido e aumentado, com sintomas de cirrose e hepatite, mudanças na composição e postura dos ovos, além da redução no consumo de ração (BIBU, 2011).

Nos cavalos, os sinais clínicos provocados pelas aflatoxicoses não são específicos, podendo consistir na redução do apetite, depressão, febre, tremores, ataxia e tosse, observam-se nas necropsias fígado marrom-amarelado, necrose centrolobular, icterícia, hemorragia, inflamação na traqueia e urina marrom (CALONI; CORTINOVIS; 2011).

Em animais de companhia, cães e gatos, as aflatoxicoses provocam grave depressão, perda de apetite, vômitos, fraqueza e podem levar à morte. Já animais ruminantes, como bovinos, ovinos, cabras e veados possuem menor sensibilidade aos efeitos das aflatoxinas, embora possam ter reduzido o crescimento e o desempenho produtivo e reprodutivo, contaminando subprodutos como leite e carne (ZAIN, 2011).

A ingestão de aflatoxina B₁ por bovinos em lactação, através do consumo de rações contaminadas, transfere em algumas horas 1 a 3% da toxina ao leite, através de seu derivado hidroxilado denominado aflatoxina M₁. Logo, derivados como queijo, ricota, iogurte, nata, manteiga, entre outros, podem estar contaminados (ARAÚJO, 2011). Navarro (2011) observou a presença de aflatoxina M₁ em 93,5% das 62 amostras de leite coletadas em propriedades leiteiras da região dos Campos Gerais, entre 2009/2010, em níveis de 0,045 a 0,442 µg L⁻¹. As quantidades detectadas se encontram abaixo do LMT pela legislação brasileira para o leite fluído (0,5 µg L⁻¹), mas acima do LMT pela União Europeia como alimento seguro (0,05 µg L⁻¹).

Segundo Scussel (2002), desconhecem-se espécies que não sofram com os efeitos das aflatoxinas, entretanto, dependendo da espécie e do estado imunológico algumas são mais suscetíveis. Animais jovens e fêmeas prenhes são mais vulneráveis às implicações das aflatoxicoses e, ainda, as fêmeas prenhes podem transferir os efeitos ao feto. Os machos são mais sensíveis que fêmeas. Para aves e peixes, doses de 10 a 30 µg kg⁻¹ de aflatoxina B₁ podem causar carcinoma hepático e, para roedores, os efeitos podem ser causados por doses entre 15 e 1000 µg kg⁻¹ (BURAGAS, 2005)

3.8 Metodologias para detecção de aflatoxinas

Assim como a presença ou ausência de fungos filamentosos, com potencial toxigênico em meio aos grãos, não determina a contaminação por micotoxinas, a presença de aflatoxinas não pode ser diagnosticada visualmente. Isto ocorre porque estas toxinas são incolores, inodoras e não modificam o sabor dos alimentos, sendo comumente encontradas em grãos de milho assintomáticos aparentemente de boa qualidade, por isso são necessárias análises para detecção e quantificação.

Tais análises requerem o uso de metodologias sensíveis, exatas e reprodutíveis. Desde a descoberta e caracterização das principais micotoxinas: aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina, zearalenona, desoxinivalenol e patulina tem havido um progresso significativo no desenvolvimento e aprimoramento de métodos analíticos de detecção (LINO; SILVA; PENA, 2006). A escolha do método a ser empregado deve considerar propriedades químicas e físicas da toxina, matriz alimentar, aplicabilidade, custo e eficiência. O grau de confiabilidade é caracterizado pela precisão, exatidão, sensibilidade, estabilidade e especificidade do método utilizado (SOARES, 2006; ONO *et al.*, 2007).

As aflatoxinas podem ser detectadas por métodos físico-químicos e biológicos. Os físico-químicos incluem cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) e cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS). As técnicas biológicas incluem os imunoenaios, ensaio imunoenzimático (ELISA) e colunas de imunoafinidade (CIA) para a limpeza e concentração de extratos alimentares (AMARAL; MACHINSKI JUNIOR, 2006; HAYASHI, 2007).

A metodologia analítica é composta por algumas etapas: amostragem, preparo das amostras (homogeneização, moagem, extração e limpeza), detecção e quantificação. Para Ono *et al.* (2007), a amostragem é a etapa mais importante do processo, pois se a amostra não representar o total dos grãos, o resultado obtido não poderá ser assumido como válido. Cruz (2010) descreve que na contaminação de produtos agrícolas por aflatoxinas nem sempre a ocorrência da toxina é uniforme em todo lote de grãos.

Em teoria, o preparo ideal da amostra elimina todos os interferentes, deixando somente os componentes de interesse para serem analisados, porém, na prática sempre ocorre uma perda de analito, a grande questão é tornar essa perda mínima. Quando a amostra é seca, como é o caso do milho a primeira coisa a ser realizada é a moagem, cujo tamanho final das partículas deve estar entre 0,5-1,0mm. Em seguida, para extração do componente de interesse da amostra, são utilizadas soluções-aquosas derivadas da mistura de solventes polares. As mais utilizadas são: metanol:água (70:30), metanol:água (6,5:3,5),

metanol:água (80:20), acetonitrila:água (9:1); celite:água:clorofórmio (25:10:250), metanol: cloreto de potássio (9:1) e clorofórmio:água (30:1).

Como a granulometria das partículas da amostra tem influência na eficiência da extração, ao término do processo deve-se filtrar o extrato bruto, contudo, permanecem ainda muitas impurezas, por isso é realizado um processo de purificação. Para isso, existem vários mecanismos: colunas de extração em fase sólida (SPE), colunas de fase reversa, cartuchos de troca iônica forte (SAX), colunas de imunoafinidade (CIA) ou o uso de clarificantes (sulfato de cobre ou sulfato de amônio) (AMARAL; MACHINSKI JUNIOR, 2006).

Muitas pesquisas que avaliam a contaminação por aflatoxinas em matrizes milho, rações e outros subprodutos do milho vem utilizando as CIA na etapa de purificação dos extratos (HAYASHI, 2007; CRUZ, 2010; ROSSI, 2011; FERREIRA *et al.*, 2013; MULUNDA *et al.*, 2013). As CIA possuem anticorpos específicos à micotoxina a ser analisada e que se ligam ao analíto, fazendo a retenção seletiva da micotoxina na coluna. A posteriori faz-se a lavagem com água ultra-purificada e a eluição com solvente para o rompimento da ligação antígeno-anticorpo. Os solventes mais recomendados para a etapa de eluição das aflatoxinas da CIA são metanol ou acetonitrila. A desvantagem destas colunas é o alto custo comercial.

Em geral, os métodos cromatográficos e de espectrometria de massa são mais sensíveis e específicos, apesar de onerosos, complexos, demorados e exigirem qualificação técnica na realização das análises. Os métodos imunológicos como os kits ELISA são mais simples, rápidos, específicos e portáteis, entretanto, são mais utilizados em análises de triagem e têm como inconveniente o custo elevado (ROSSI, 2011). Além dos resultados falso-positivos e falso-negativos, baixa reprodutividade e grande variabilidade dos resultados não possibilitam diferenciar resíduos múltiplos (LINO; SILVA; PENA, 2006).

Dentre os métodos já utilizados, a CLAE com detector de fluorescência vem ocupando lugar de destaque nas últimas pesquisas (HAYASHI, 2007; ECKERT, 2011; CRUZ, 2010; ROSSI, 2011; BENTO *et al.*, 2012; VEIT, 2013; FERREIRA *et al.*, 2013). A cromatografia, seja ela CCD, CG ou CLAE, compreende um método físico-químico de separação de compostos de uma mistura por migração diferencial. Os componentes da mistura são distribuídos entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária, alternada e rapidamente um número incontável de vezes, de modo que a velocidade de migração dos compostos da mistura se torna diferente entre estes, conforme a afinidade com cada fase, ocorrendo uma separação ao fim do processo (SOARES, 2006).

Na CLAE, a fase móvel é um líquido e as fases estacionárias podem ser líquidas ou sólidas. Para Cechi (2003), a CLAE possui vantagens e desvantagens em relação às demais técnicas, dentre as quais se destacam maior resolução, reprodutibilidade,

sensibilidade, automação e rapidez por empregar pressão na realização das análises, permite a análise de amostras com grande variabilidade de massa molecular, voláteis e termicamente instáveis. Entretanto, a técnica requer extensivo processo de limpeza e derivatização, além de o equipamento ser caríssimo, os custos de manutenção e operação são onerosos.

Contudo, a cromatografia faz a separação dos compostos da amostra, mas não os identifica, para isso são utilizados: padrões analíticos conhecidos, reações químicas, espectro de massas, testes de imunoafinidade, características do espectro ultravioleta, infravermelho ou fluorescente (SOARES, 2006). Na detecção de aflatoxinas, o mais usual para identificação são os padrões analíticos, com os quais são obtidas as curvas de calibração e, por meio de regressão linear, são feitas as quantificações.

3.9 Análise dos componentes principais (ACP)

A técnica de análise dos componentes principais (ACP), apesar de antiga, tem poucas aplicações encontradas na literatura, principalmente em relação à contaminação de grãos por micotoxinas. Udoh, Cardwell e Ikotun (2000), avaliando a contaminação de milho por aflatoxinas, em diferentes sistemas de armazenagem utilizados em cinco regiões da Nigéria, aplicaram a ACP para identificar variáveis significativas dentro de cada sistema linear. Jin *et al.* (2009) utilizaram ACP para reduzir a dimensionalidade dos atributos de detecção de cepas toxigênicas de *A. flavus*. Também Souza (2011) aplicou a ACP na avaliação do efeito da adubação orgânica e/ou mineral na contaminação de diferentes cultivares de milho por fungos e fumonisinas.

ACP é uma análise multivariada cuja principal finalidade é transformar um conjunto de variáveis em um novo conjunto menor, com variáveis não correlacionadas que mantêm ao máximo a variabilidade do conjunto original com a menor perda possível de informação. As novas variáveis, denominadas componentes principais (CPs), são independentes e ortogonais entre si, geradas por combinação linear das originais e são descritas em ordem decrescente de variância (KHATTREE; NAIK, 2000).

Quando as variáveis a serem analisadas estão em diferentes escalas, primeiramente calcula-se a matriz de correlação para padronização dos dados X_1, X_2, \dots, X_p em Z_1, Z_2, \dots, Z_p e, a partir desta matriz, procede-se a ACP, transformando o conjunto destas variáveis (Z_1, Z_2, \dots, Z_p) em um novo conjunto CP_1, CP_2, \dots, CP_p , em que o primeiro componente principal (CP_1) é a combinação das variáveis que explica a maior proporção da variação total dos

dados. O segundo CP define a maior proporção seguinte e, assim, sucessivamente (JOLLIFFE, 1986).

A variância contida em cada CP é expressa pelos autovalores da matriz padrozinada, de tal forma que o maior autovalor está associado ao primeiro componente principal (CP₁), o segundo maior autovalor ao CP₂ e, assim, consecutivamente (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012). A definição do número de componentes utilizados é realizada com base em vários critérios, dentre eles o critério de Kaiser (1960) que é bastante conhecido, no qual se utilizam apenas os componentes que possuem autovalor (λ) maior ou igual a 1.

A interpretação de cada componente principal é realizada mediante a influência que cada variável apresenta sobre esse componente, ou seja, pela correlação entre a variável X_j e o componente CP_i. As interpretações devem ser realizadas separadamente por CP, pois não se correlacionam entre si (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2012).

Para Barbosa *et al.* (2005), em certas situações os pesquisadores tendem a avaliar um grande número de características, gerando aumento de trabalho e de gastos na pesquisa, sendo possível que algumas destas características contribuam pouco com a proposição avaliada, podendo ser eliminadas. Nesse sentido, a ACP pode auxiliar na escolha de quais variáveis não apresentam informação adicional e podem ser descartadas, de forma a resumir a informação contida no complexo de variáveis originais, através da correlação entre as variáveis e as escores das CPs.

Objetiva-se, com a análise dos componentes principais, determinar dentre as catorze características aferidas nesta pesquisa (teor de água, cinzas, proteínas, lipídios, grãos sem defeito, peso de mil grãos, peso volumétrico, contagem de *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., total de bolores e leveduras e contaminação por aflatoxinas), quais são mais influentes na qualidade do milho armazenado sob o ponto de vista estatístico e entender o seu inter-relacionamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da pesquisa

Neste estudo, foram conduzidos dois experimentos de armazenagem de milho em condições ambientais sob diferentes tipos de acondicionamentos, na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), *campus* Dois Vizinhos, situada na região sudoeste do Estado do Paraná, latitude 25°,44',35" Sul, longitude 53°,4',30" Oeste e altitude de 509 m. Essa localidade possui clima temperado subtropical úmido com verões quentes, cujas maiores temperaturas ocorrem de setembro a abril e as menores de maio a agosto.

No armazenamento de inverno (experimento I) foi utilizado milho colhido na safra de inverno 2012, enquanto no armazenamento de verão (experimento II) o milho foi colhido na safra de verão 2012/2013. As amostras utilizadas nos dois experimentos são dos híbridos 2B688RR e 30K73Hx. O híbrido Dow Agrosiences 2B688RR possui transgenia de resistência ao herbicida "Roundup[®]"², é um híbrido de ciclo precoce, grão semi-duro alaranjado, recomendado tanto para grãos como para silagens com plantio inverno e verão. Enquanto o híbrido Pioneer 30K73Hx é um híbrido simples, com grão duro alaranjado, de ciclo precoce, melhorado com a tecnologia Herculéx, que possibilita maior proteção contra lagartas.

As Figuras 4 (a) e (b) retratam as condições climáticas do período de cultivo destes híbridos, desde o plantio até a colheita.

² O Roundup é um herbicida fabricado pela Monsanto cuja base é o glifosato. Marca registrada Monsanto Company / USA.

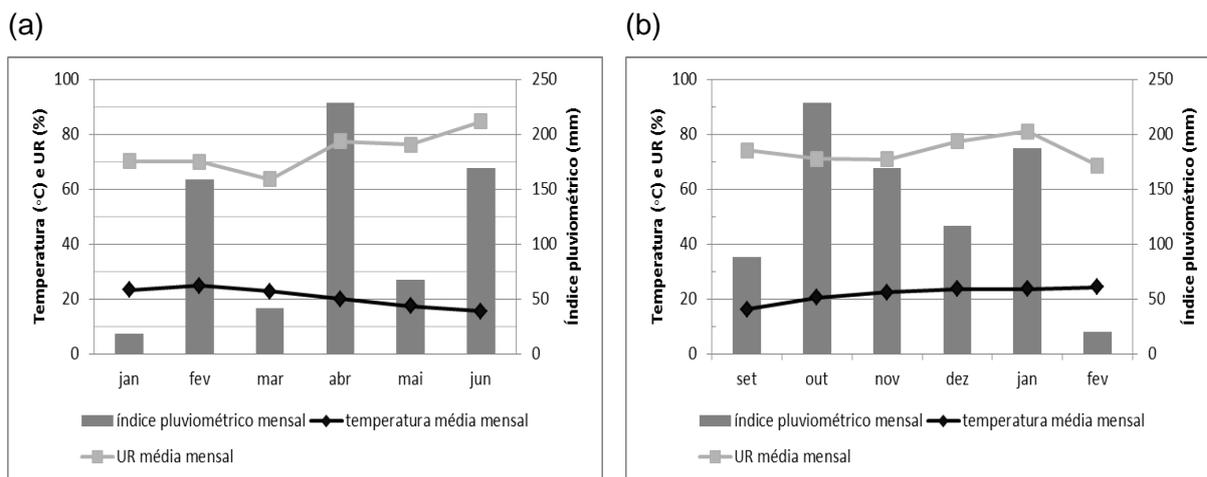


Figura 4 Dados climatológicos (temperatura média mensal (°C), UR média mensal (%), índice pluviométrico mensal (mm)) referentes aos períodos de cultivo dos híbridos de milho utilizados nos experimentos de armazenagem. (a) Safra de inverno 2012 (plantio em 25/01/2012 e colheita em 28/06/2012); (b) Safra de verão 2013/14 (plantio em 17/09/2012 e colheita em 18/02/2013).

Fonte: Estação meteorológica automática do INMET, localizada na UTFPR, *campus de Dois Vizinhos* (<http://www.inmet.gov.br>).

A escolha dos híbridos de milho utilizados nesta pesquisa foi aleatória e influenciada por fatores climáticos, dado que, para o armazenamento de inverno (safra de inverno 2012), haviam sido cultivados outros 2 híbridos, no entanto, antes de atingir a maturidade fisiológica estes foram gravemente afetados por intempéries climáticas (geadas) e precisaram ser substituídos, para tanto, buscou-se na região Sudoeste do Paraná lavouras que continham milho safrinha, obtendo-se os híbridos 2B688RR e 30k73Hx, cada qual com um produtor. Enquanto no armazenamento de verão (safra de verão 2012/2013), cultivaram-se em parceria com um terceiro produtor os mesmos híbridos, ambos sob as mesmas condições de manejo, segundo as recomendações técnicas de cultivo convencional.

4.2 Caracterização das amostras

As amostras de milho utilizadas nos experimentos de armazenagem foram coletadas em espiga e em grãos. As espigas foram colhidas manualmente e os grãos mecanicamente por colhedora automotriz³. O teor de água na colheita dos grãos da safra de inverno 2012 foi 29,94 e 31,5% b.u., respectivamente para os híbridos 30k73Hx e 2B688RR. Na safra de

³ Colheitadeira marca New Holland TC5090

verão 2012/2013, o teor de água ficou em, na mesma ordem, 26,97 e 30,02% b.u. A colheita da primeira safra foi realizada nos dias 27/06/2012 e 28/06/2012 e a segunda safra em 18/02/2013.

Logo após a colheita, as amostras foram secas pelo método de secagem natural ao sol (Figura 5), colocadas sobre lonas plásticas durante o período diurno e recolhidas ao entardecer e/ou em dias chuvosos, com revolvimento periódico da massa e monitoramento da temperatura solar através de termômetro. O término da secagem só ocorreu quando as amostras atingiram teor de água abaixo de 13% b.u. A determinação desse teor acontecia paralelamente ao processo de secagem, por meio de um medidor universal, com intuito de controlar o período de duração do processo. Tendo em vista uma melhor precisão, no primeiro dia de armazenagem realizou-se a aferição pelo método padrão da estufa a 105 ± 3 °C por 24 horas, segundo as regras para análise de sementes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009).

Os grãos secos (03/07/2012 safra de inverno e 26/02/2013 safra de verão) foram levados ao processo de limpeza em máquina classificadora de grãos e sementes⁴ e em seguida a armazenagem (04/07/2012 safra de inverno e 27/02/2013 safra de verão).



Figura 5 Secagem natural ao sol das amostras de milho em grãos e espigas.

4.3 Caracterização da armazenagem

Os experimentos de armazenagem ocorreram durante 12 meses, respectivamente entre julho/2012 a julho/2013 e fevereiro/2013 a fevereiro/2014, sob condições ambientais, em sala de alvenaria localizada na UNEP Pequenos Animais na UTFPR, *campus* de Dois

⁴ Marca Macanuda, CAM-25.

Vizinhos. A sala era constituída por porta de madeira e janelas basculantes em uma das paredes, possuindo área aproximada de 10 m² e ventilação oriunda das janelas basculantes (semiabertas). Durante os períodos de armazenagem monitoraram-se as condições ambientais de temperatura e de umidade relativa do ar, por meio de um termohigrográfo instalado na sala e da estação experimental automática do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), localizada no *campus* da universidade. As condições climatológicas estão retratadas nas Figuras 6 (a) e (b). Foi realizado o controle das principais pragas de armazenagem, como roedores pelo uso de iscas, insetos através de medidas curativas (fumigantes) e o impedimento do acesso de pássaros.

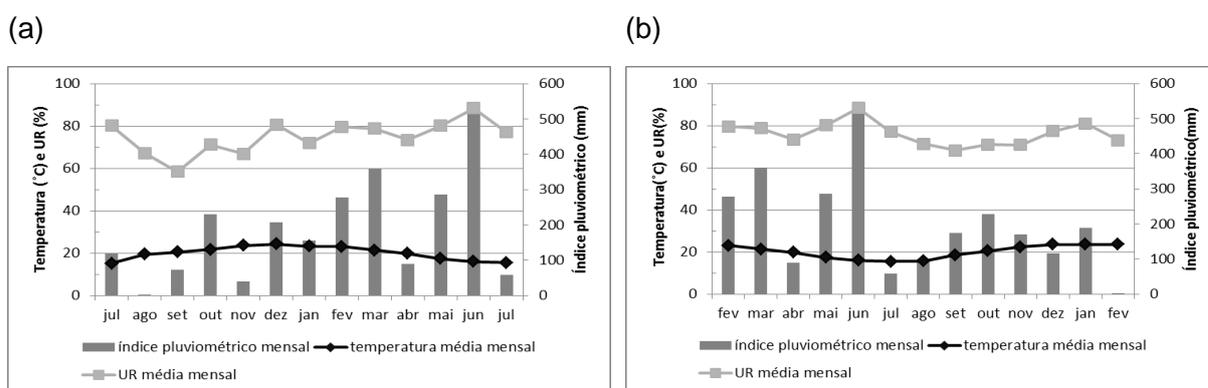


Figura 6 Condições climatológicas (temperatura média mensal (°C), UR média mensal (%), índice pluviométrico mensal (mm)) durante os experimentos de armazenagem. (a) Safra de inverno (julho/2012 a julho/2013); (b) Safra de verão (fevereiro/2013 a fevereiro/2014).

Fonte: Estação meteorológica automática do INMET, localizada na UTFPR, *campus* de Dois Vizinhos (<http://www.inmet.gov.br>).

Em cada experimento as armazenagens ocorreram sob 4 tipos de acondicionamentos por híbrido de milho: (a) em sacarias convencionais de polipropileno, com dimensão 38 x 52 cm e capacidade de 4 kg de grãos cada, empilhadas sobre estrados de madeira; (b) em mini silos metálicos (30 cm de diâmetro por 50 cm de altura), com capacidade de 20 kg cada e sem sistema de aeração; (c) em bolsas de polietileno seladas hermeticamente, construídas com dupla camada (lona de polietileno dupla face espessura 200 µm e camada interna polietileno para vácuo espessura 0,18 µm), dimensão 40 x 50 cm e capacidade 4 kg de grãos cada, empilhadas sobre estrados de madeira; (d) em espigas dispostas sobre cestos plásticos com, aproximadamente, 60 kg cada. Esses acondicionamentos estão ilustrados nas Figuras 7 (a), (b), (c) e (d). Em cada experimento de armazenagem foram montadas três repetições de silos metálicos e de cestos com espigas, além de 18 unidades de sacarias convencionais e de bolsas seladas hermeticamente para cada híbrido de milho.

(a)



(b)



(c)



(d)



Figura 7 Tipos de acondicionamentos de armazenagem utilizados nos experimentos de armazenagem. (a) em sacarias convencionais de polipropileno; (b) em mini silos metálicos; (c) em bolsas de polietileno seladas hermeticamente; (d) em espigas.

4.4 Análises realizadas

Foram realizadas as seguintes análises nos grãos de milho: teor de água, cinzas, lipídios, proteínas, classificação (grãos sem defeito), peso volumétrico, peso de mil grãos, contagem total de bolores e leveduras, incidência dos principais gêneros potencialmente toxigênicos (*Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*) e ocorrência de aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2). As análises foram efetivadas no início do armazenagem, tempo 0 e aos 3, 6, 9 e 12 meses. A cada período de tempo coletavam-se, aleatoriamente, 3 amostras por híbrido em cada acondicionamento de armazenagem, ou seja, 3 sacarias de polipropileno, 3 bolsas herméticas, cerca de 50 espigas e aproximadamente 3 kg de grãos em cada silo

metálico, com auxílio de um calador graneleiro. Após a abertura para retirada de amostras, as bolsas eram seladas hermeticamente e as sacarias convencionais eram descartadas.

As análises de ocorrência de aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade (LACON), situado nas dependências da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, *campus* de Cascavel e as demais nos Laboratório de Bromatologia e Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, *campus* de Dois Vizinhos.

4.5 Metodologias empregadas nas análises

4.5.1 Determinação do teor de água

A determinação do teor de água (%) das amostras (em grão) foi realizada imediatamente após cada coleta, pelo método padrão da estufa a 105 ± 3 °C por 24 horas, seguindo as regras de análises para sementes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009).

4.5.2 Preparo das amostras para as análises do teor de cinzas, lipídios e proteínas

Sub-amostras de 500 g de grãos, de cada unidade experimental, foram moídas em moinho de facas⁵, peneiradas em granulometria 20 *mesh* e embaladas em sacos plásticos de polietileno (com dimensões 15,5 x 22 cm e 0,10mm de espessura). Na sequência realizaram-se as análises em triplicata.

4.5.3 Determinação do teor de cinzas ou matéria mineral

A determinação do teor de cinzas (%) ou matéria mineral das amostras foi realizada por incineração em mufla a 550 °C, de acordo com a técnica 018/IV do Instituto Adolfo Lutz (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008). Os resultados foram convertidos em base seca.

⁵ Tipo Cróton, marca Tecnal, modelo TE 625.

4.5.4 Determinação do teor de lipídios ou extrato etéreo

A determinação do teor de lipídios (%) ou extrato etéreo das amostras foi realizada em aparelho extrator tipo Soxhlet⁶, de acordo com a técnica 032/IV do Instituto Adolfo Lutz (ZENEON; PASCUET; TIGLEA, 2008). Os resultados foram convertidos em base seca.

4.5.5 Determinação do teor de proteínas

A determinação do teor de proteína bruta (%) das amostras foi realizada pelo método de Kjeldhal, fazendo as etapas de digestão, destilação e titulação com a conversão 6,25 para a matriz milho, de acordo com a técnica 036/IV do Instituto Adolfo Lutz (ZENEON; PASCUET; TIGLEA, 2008). Os resultados foram convertidos em base seca.

4.5.6 Peso volumétrico ou massa específica

O peso volumétrico foi determinado pela pesagem dos grãos em um recipiente de volume conhecido e os resultados foram convertidos em kg m^{-3} , segundo as regras de análises para sementes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009) e, em seguida, corrigidos em matéria seca.

4.5.7 Peso de mil grãos

O peso de mil grãos (expresso em gramas) foi determinado pela contagem de oito repetições de 100 grãos (inteiros) e pesagem em balança analítica, média e multiplicação por 10 segundo as regras de análises para sementes, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e, em seguida, os valores foram corrigidos em matéria seca (BRASIL, 2009).

⁶ Marca Tecnal Tecnal model TE-044-8/50)

4.5.8 Grãos sem defeito

O percentual de grãos sem defeito foi calculado subtraindo-se de 100 a percentagem de grãos carunchados, avariados, ardidos, quebrados, fermentados, germinados, mofados, impurezas ou matérias estranhas, chochos ou imaturos segundo os padrões de qualidade da Instrução Normativa MAPA n° 60, de 22 de dezembro de 2011 (BRASIL, 2012).

4.6 Metodologias para isolamento e identificação dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*

Para as análises microbiológicas, separava-se 1 kg de grãos de cada unidade experimental em sacos de papel Kraft, evitando-se, assim, o manuseio destes grãos. As análises eram realizadas em duplicata, em até 24 horas após cada coleta, segundo metodologia descrita por Silva, Junqueira e Silveira (2010), por meio de diluição seriada e plaqueamento *Pour-Plate*. Sendo que 200 gramas das sub-amostras de 1 kg grãos de cada unidade experimental foram triturados em liquidificador, previamente desinfetado com etanol 70%, e 10 g, e transferidas de forma asséptica a um erlenmeyer com 90 mL de água peptonada estéril 0,1%, obtendo-se a diluição 10^{-1} . A partir dessa, diluições sucessivas foram realizadas em tubos de ensaio contendo a mesma solução diluente estéril, até a obtenção da diluição 10^{-5} . Um mililitro das diferentes diluições foi transferido para placas de *Petri*, previamente esterilizadas e secas, por meio da técnica *Pour-Plate* com Agar Batata Dextrose 3,9% (BDA) acidificado com ácido tartárico 10% (pH 4,0). Essas placas foram incubadas em estufa bacteriológica BOD⁷ a 25 °C por 6 dias, quando se realizou a contagem manual das colônias. Os resultados foram obtidos através da média aritmética das placas de mesma diluição, multiplicados pelo inverso da diluição inoculada e expressos em unidades formadoras de colônias por grama (UFC g⁻¹).

Após a contagem, os diferentes tipos morfológicos de colônias foram isolados em BDA (3,9%, pH 4,0), incubados em BOD por 6 dias e armazenados em geladeira a 7 °C. A partir das colônias puras, realizou-se a técnica de microcultivo para avaliação das estruturas microscópicas.

⁷ Marca Solab, modelo SL 200/304.

As colônias com características do gênero *Fusarium sp.* foram cultivadas em meio ágar folha de craveiro (CLA), entre 20 a 40 dias em BOD a 25 °C, com fotoperíodo 12 horas luz negra (NUV) e 12 horas escuro, segundo metodologia descrita por Querales (2010).

A identificação dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* foi realizada de acordo com Singh *et al.* (1991), com base nos aspectos morfológicos das colônias (cor, textura e superfície) e microscópicos das estruturas vegetativas e reprodutoras.

4.7 Metodologias para análise de aflatoxinas

Para as análises de ocorrência de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, sub-amostras de 1 kg de grãos, de cada unidade experimental, foram moídas (tamanho da partícula 20 mesh) em moinho de facas⁸, desinfetado com etanol 70% a cada passagem de amostra e, em seguida, embaladas em sacos plásticos de polietileno (com dimensões 15,5 x 22 cm e 0,10 mm de espessura) e congeladas a -18 °C, até a realização das análises.

As análises foram realizadas segundo o método oficial AOAC 991.31 (AOAC, 2012), recomendado pelo fabricante das colunas de imunoafinidade Aflatest[®] (Vicam), por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A extração foi efetuada com 50 g da amostra moída, 5 g de NaCl e 100 mL de metanol-água (80:20 v/v), acondicionados em erlenmeyer (capacidade 250 mL). A mistura foi homogeneizada por uma hora em agitador mecânico a 150 rpm (rotações por minuto), filtrada em filtro qualitativo e 10 mL deste filtrado foram transferidos para tubos tipo Falcon (capacidade 50 mL) e adicionados 40 mL de água ultra-purificada (Mili-Q) e, em seguida, centrifugados por 10 minutos a 5000 rpm e filtrados em filtro de microfibras de vidro (1,5 µm, Milipore). Desse extrato, 10 mL foram recolhidos para purificação por meio de uma coluna de imunoafinidade, adaptada a um manifold conectado a um sistema de vácuo com fluxo de 1-2 gotas por segundo. Após a passagem do extrato, a coluna foi lavada com a passagem de 20 mL de água ultra-purificada (Mili-Q) e as aflatoxinas foram eluídas com 1 mL de metanol grau CLAE e recolhidas em frasco vial âmbar (capacidade 1,5 mL).

A solução analisada foi obtida da junção de 200 µL do eluato com 700 µL da solução derivatizante (ácido trifluoracético:ácido acético: água (2:1:7 v/v)), agitada por turbilhamento em vórtex, mantida em banho maria⁹ a 65 °C por 10 min e, após retornar à temperatura

⁸ Tipo Cróton, marca Tecnal, modelo TE 625.

⁹ Marca Logen LS4S-D.

ambiente, foi desgaseificada em banho de ultrassom¹⁰, frequência de 80 Hz e 100% de potência por 10 minutos. Em seguida, a solução foi filtrada em filtro de seringa (0,45 µm PTFE-45/25, Chromafil Xtra).

Foram injetados 20 µL desta solução em um sistema CLAE com detector de fluorescência, composto por: injetor automático, bomba quaternária, forno de colunas ajustado a 40 °C, coluna cromatográfica Kromasil 100-C18 (5 µm) 4,6 x 150 mm. A fase móvel utilizada foi a mistura isocrática de água-metanol (60:40) a um fluxo de 0,8 mL.min⁻¹. O detector de fluorescência foi operado com comprimento de onda de excitação de 365 nm e emissão de 450 nm.

Para identificação e quantificação das aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂), adquiriu-se um kit de padrões analíticos (Sigma Aldrich) com 1 mg de cada toxina. Esses padrões foram dissolvidos em metanol grau CLAE para preparação das soluções de trabalho 0,025 µg mL⁻¹, 0,05 µg mL⁻¹, 0,075 µg mL⁻¹, 0,1 µg mL⁻¹ e 0,125 µg mL⁻¹. A corrida cromatográfica destas soluções permitiu a identificação do tempo de retenção de cada toxina (6,2 min. G₂, 7,9 min. G₁, 10,8 min. B₂ e 12,3 min. B₁) e a construção das curvas de calibração. As concentrações de aflatoxinas nas amostras contaminadas foram calculadas por meio de regressão linear, pelo método de mínimos quadrados.

Para quantificação do limite de detecção, realizou-se a corrida cromatográfica de uma série de diluições das soluções de trabalho e para os testes de recuperação analisaram-se em triplicata amostras de milho (branco), fortificadas com 10 µg kg⁻¹ de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

4.8 Análises estatísticas

4.8.1 Delineamento experimental

As análises estatísticas foram realizadas separadamente por experimento de armazenagem (armazenagem de inverno, armazenagem de verão) e por híbrido de milho. Ambos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado sob esquema fatorial 4 x 5, cujos fatores foram quatro tipos de acondicionamento (em sacarias convencionais; silos metálicos; bolsas herméticas; espigas) e cinco tempos de armazenagem (inicial, 3, 6, 9 e 12 meses). Totalizando 20 tratamentos por híbrido de milho

¹⁰ Marca Elmasonic P120H.

com três repetições cada e análises em triplicata. As unidades experimentais para cada híbrido de milho foram: 1 sacaria convencional de polipropileno, 1 bolsa selada hermeticamente, 50 espigas e 3 kg de grãos cada silo.

Com objetivo de propiciar uma interpretação prática e coerente, até mesmo porque os híbridos da safra de inverno 2012 foram cultivados em diferentes condições de manejo, pois são oriundos de diferentes produtores rurais, analisaram-se separadamente os delineamentos por híbrido de milho em cada experimento de armazenagem.

4.8.2 Análise de variância e teste de médias

Os resultados observados, quando necessário, foram transformados para atender às pressuposições do modelo matemático (normalidade dos dados, homocedasticidade das variâncias e independência dos erros), cujos testes de verificação aplicados foram Lilliefors, Cochran e Sinais. A seguir submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas por meio do teste Tukey, adotando-se o nível de 5% de probabilidade de erro. Com exceção, em ambos os híbridos, para a incidência de *Aspergillus* sp. do armazenamento de inverno e ocorrência de aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) dos dois armazenamentos, pois, nestas análises, não foi possível atender à hipótese da normalidade, mesmo com inúmeras tentativas de transformação, logo, utilizou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

O teste de Kruskal-Wallis é análogo ao teste F (ANOVA), cuja finalidade é a mesma: comparar 3 ou mais tratamentos (amostras) independentes, indicando se há diferença entre pelo menos dois deles, o que esse teste difere do teste F é que ele não exige as restrições de normalidade e homogeneidade das variâncias, e transforma os valores numéricos em postos, cuja comparação entre grupos é realizada pela média dos postos (VIRGILITO, 2006).

As pressuposições do modelo matemático, análises de variância e teste de Tukey foram realizadas no *software* 'R', versão 2.13.1. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado com o *software Assistat*, versão 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2006).

4.8.3 Análise dos componentes principais

Analisaram-se, também, para cada híbrido de milho, separadamente por experimento de armazenagem e independente do tipo de acondicionamento utilizado, os componentes principais (ACP), com o *software Assistat*, versão 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2006).

A interpretação do coeficiente de correlação linear (r) entre os escores das componentes principais (CPs) e as características de qualidade do milho armazenado foi realizada com base em dois critérios. O primeiro está relacionado ao teste-T, pelo qual um conjunto de 54 dados possui correlação linear significativa, a 5% de significância se $|r| \geq 0,274$, sendo $|r|$ o valor absoluto do coeficiente de correlação. O segundo critério está relacionado à classificação descrita por Callegari-Jacques (2003), em que a correlação linear é fraca se $0 < |r| \leq 0,30$, moderada se $0,30 < |r| \leq 0,60$, forte se $0,60 < |r| \leq 0,90$ e muito forte se $0,90 < |r| \leq 1$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Armazenamento do milho safra de inverno ou safrinha

O milho cujo plantio é realizado entre janeiro e abril é definido como milho safrinha ou de sequeiro. O armazenamento deste tipo de milho ocorreu durante doze meses, no período de jul/2012 a jul/2013, em quatro tipos de acondicionamentos (sacarias convencionais, bolsas herméticas, silos metálicos e espigas). Avaliaram-se atributos de qualidade dos grãos, incidência fúngica e ocorrência de aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) em dois híbridos de milho (2B688RR, 30K73Hx) cultivados na safrinha de inverno 2012. As análises foram realizadas durante a armazenagem em cinco períodos de tempo (inicial, 3, 6, 9 e 12 meses). Como os híbridos de milho foram cultivados em condições distintas de manejo, os resultados a seguir são apresentados e discutidos separadamente por híbrido, de acordo com o esquema fatorial 4 x 5 (quatro acondicionamentos de armazenagem x cinco tempos de análise).

5.1.1 Condições climáticas durante o armazenamento do milho safra de inverno

A armazenagem deste experimento ocorreu sob as condições climatológicas visualizadas na Figura 6 (a). A região sudoeste do Paraná, onde se localiza o município de Dois Vizinhos e a Universidade Tecnológica Federal do Paraná, onde foram conduzidos os experimentos de armazenagem, tem como característica clima subtropical úmido mesotérmico, com verões quentes e geadas frequentes, não existindo estação seca definida. Durante o período de armazenagem (jul/2012 a jul/2013), a temperatura do ar oscilou entre 2,7 e 35,6 °C, sendo que as maiores temperaturas ocorreram de out/2012 a mar/2013, respectivamente dos 3 aos 8 meses de armazenagem, com média mensal mínima de 15 °C (jul/2012 e jul/2013) e máxima de 24,3 °C (dez/2012). A umidade relativa do ar oscilou entre 19 e 98%, tendo como média mensal mínima 58,4% (set/2012) e máxima 88,4% (jun/2013), estando (a média) acima de 71,9% de dez/2012 a jul/2013.

5.1.2 Atributos de qualidade dos grãos de milho armazenados na safra de inverno

Para o milho híbrido 2B668RR, a interação tipo de acondicionamento e tempo de armazenagem teve influência significativa ($p < 0,05$) no teor de água, cinzas, lipídios, proteínas, percentagem de grãos sem defeito, peso volumétrico e peso de mil grãos (Tabelas 2-5, 7, 10 e 11).

Já no milho híbrido 30K73Hx somente os parâmetros teor de água, cinzas, lipídios, peso volumétrico e peso de mil grãos tiveram influência significativa ($p < 0,05$) da interação, tipo de acondicionamento e tempo de armazenagem (Tabelas 2-4, 10 e 11). Enquanto o conteúdo de proteínas teve influência ($p < 0,05$) somente do fator tempo (Tabela 6) e os grãos sem defeito foram influenciados ($p < 0,05$) por ambos os fatores, individualmente (Tabelas 8 e 9)

5.1.2.1 Teor de água

No híbrido de milho 2B688RR (Tabela 2) observa-se um progressivo aumento do teor de água dos grãos, conforme o tempo de armazenagem no acondicionamento em sacarias convencionais. Nos grãos armazenados em silo houve redução somente aos 6 meses, no acondicionamento hermético o teor de água dos grãos reduziu a partir dos 6 meses, apresentando o menor índice entre todos os tipos de acondicionamentos a partir dos 9 meses de armazenagem. Isso porque, nesta forma de armazenagem, não há troca de gases e/ou vapor de água da massa de grãos com o ambiente, deste modo as variabilidades podem ser justificadas pelas atividades biológicas da massa de grãos (FARONI et al., 2005; SANTOS et al., 2012). Embora as espigas tenham sido armazenadas com maior teor água, devido à dificuldade de uniformização durante a secagem, aos 3 meses os grãos destas estavam com o menor índice de umidade entre todos os acondicionamentos e, a partir desse ponto, o teor de água só aumentou sendo o maior dentre os grãos dos demais acondicionamentos a partir dos 6 meses. Constata-se aos 12 meses que o milho tanto das espigas quanto das sacarias continham umidade acima do limite recomendado (13%) para um armazenamento seguro (MOHALE et al., 2013). E, ainda, o milho armazenado em espigas possuía teor de água acima de 14%, faixa máxima admitida pela classificação oficial brasileira de comercialização (BRASIL, 2012).

Em relação ao teor de água, os grãos do híbrido de milho 30K73Hx (Tabela 2), quando armazenado em espigas, apresentaram os maiores percentuais no início e no fim da armazenagem. Enquanto os grãos acondicionados em sacaria e silo tenderam a aumentar os níveis de água com o tempo. No acondicionamento hermético os grãos mantiveram os

níveis durante a armazenagem, apresentando, após os 3 meses, os menores teores de água em relação aos demais acondicionamentos. Costa *et al.* (2010) também não verificaram variação no teor de água dos grãos de milho armazenados em bolsas seladas hermeticamente. O milho armazenado em espigas e nas sacarias obtiveram os maiores teores água, sendo no primeiro acondicionamento do sexto mês em diante e no segundo a partir do nono mês, estando ambos aos 12 meses acima de 13%.

Tabela 2 Teor de água (%)⁽¹⁾ dos grãos de milho submetidos aos diferentes acondicionamentos de armazenagem, durante 12 meses

Tempo (meses)	Formas de Armazenagem			
	Sacaria	Hermética	Silo	Espiga
2B688RR				
0	12,41±0,15 ^{Bb}	12,41±0,15 ^{Ab}	12,41±0,15 ^{Ab}	13,14±0,23 ^{Aa}
3	12,14±0,21 ^{Ba}	12,30±0,17 ^{Aa}	11,83±0,46 ^{Ab}	10,98±0,38 ^{Cb}
6	12,35±0,17 ^{Ba}	11,47±0,43 ^{Bb}	11,38±0,13 ^{Bb}	12,52±0,32 ^{Ba}
9	12,80±0,22 ^{ABab}	11,14±0,07 ^{Bc}	12,32±0,24 ^{Ab}	12,97±0,19 ^{Ba}
12	13,36±0,34 ^{Ab}	11,36±0,08 ^{Bd}	12,45±0,29 ^{Ac}	14,46±0,70 ^{Aa}
CV(%)= 2,31				
30K73Hx				
0	11,57±0,12 ^{Db}	11,57±0,12 ^{Ab}	11,57±0,12 ^{Cb}	13,48±0,19 ^{Aa}
3	11,93±0,15 ^{CDa}	11,90±0,13 ^{Aa}	11,70±0,05 ^{BCa}	11,25±0,09 ^{Cb}
6	12,06±0,21 ^{Cb}	11,73±0,07 ^{Abc}	11,45±0,15 ^{Cc}	12,58±0,40 ^{Ba}
9	12,86±0,32 ^{Ba}	10,90±0,17 ^{Bc}	12,09±0,35 ^{ABb}	12,56±0,10 ^{Ba}
12	13,53±0,29 ^{Aa}	11,58±0,12 ^{Ac}	12,36±0,10 ^{Ab}	13,45±0,19 ^{Aa}
CV(%)=1,54				

Notas: ⁽¹⁾ Valores médios de três repetições, expressos em percentagem e base úmida. ± seguido pelo desvio padrão da média. Médias seguidas de letras distintas, minúscula na linha e maiúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. CV(%): coeficiente de variação.

Para Coradi (2010), elevados teores de água nos grãos, durante a armazenagem, podem aumentar os riscos de contaminação fúngica, principalmente pelos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Lazzari (1997) recomenda, para manutenção da qualidade dos grãos de milho durante o armazenamento, que o teor de água seja no máximo 13%, para o período de um ano e para períodos maiores de armazenagem recomenda que o máximo esteja em 12%.

O aumento no teor de água do milho acondicionado em sacarias, silo e espigas de ambos os híbridos (Tabela 2), a partir dos 6 meses, está diretamente relacionado ao comportamento da umidade relativa do ar (Figura 1), que se manteve, em média, acima de 75%, de dez/2012 a jun/2013 (do 5º ao 11º mês de armazenagem). Para Faroni (1998), pequenos aumentos na umidade relativa, acima da faixa 70-75%, implicam grandes aumentos no teor de água dos grãos armazenados. O acondicionamento hermético

apresentou os menores teores de água ao longo do tempo, em ambos os híbridos, parâmetro importante na manutenção da qualidade dos grãos durante o armazenamento e limitador da proliferação fúngica (FARONI *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2012).

Antonello *et al.* (2009) não detectaram variação do grau de umidade de grãos de milho de três variedades armazenados por 6 meses em sacos de tecido (algodão) e garrafas plásticas (PET de dois litros). Saleemullah *et al.* (2006), comparando o teor de água de grãos de milho controle e inoculados com *Aspergillus flavus*, observaram 10,8% de aumento do teor de água, durante a armazenagem, nos grãos que continham o inóculo.

Silva (2007a), avaliando amostras de milho coletadas em duas fábricas de rações para aves na Bahia, constatou variação do teor de água nos grãos 10,1 a 13,8%. Segundo ele, grãos armazenados por longos períodos com alta umidade criam um microclima ideal ao desenvolvimento fúngico e à produção de micotoxinas.

O teor de água dos grãos é fortemente influenciado pelo equilíbrio higroscópico dos grãos e com as condições ambientais, sendo que os grãos ficam dispostos a ganhar ou perder água para o ambiente. Quando a pressão do vapor do grão é menor que a do ar circundante ocorre o fenômeno de adsorção, ganho de umidade e, em contrapartida, se a pressão do vapor de água do grão for maior que do ar circundante, ocorre o fenômeno de dessorção, perda de umidade (SILVA *et al.* 1995). O processo de equilíbrio higroscópico depende da composição química do grão, integridade física, condições sanitárias, gradientes termo-hídricos e das condições pós-colheita (secagem e armazenagem) (DELIBERALI *et al.*, 2010).

A presença de insetos interfere no teor de água dos grãos, pois as infestações não controladas podem provocar aumento da temperatura, criando bolsas de calor em meio à massa de grãos que possibilitam a migração da umidade (FARONI, 1998).

5.1.2.2 Conteúdo de cinzas ou matéria mineral

O conteúdo de cinzas ou matéria mineral dos grãos é um parâmetro qualitativo da massa, cujo aumento durante período de armazenagem reflete o aumento no processo de degradação dos grãos (FERRARI FILHO *et al.*, 2012).

De maneira geral, a percentagem de cinzas do híbrido de milho 2B688RR (Tabela 3) aumentou até os 6 meses de armazenagem nos acondicionamentos em sacaria, hermética e silo, com máximo conteúdo aos 6 meses de armazenagem, isto é, no mês de jan/2013, no qual foi registrada a terceira maior média mensal temperatura do ar (23,2 °C) durante o período de armazenagem (antecedida por 24,3 °C em dez/2012 e 23,6 °C em nov/2012). O aumento da temperatura do ar, que foi constatada a partir dos 3 meses de armazenagem

(out/2012), provoca aumento da taxa respiratória dos grãos e do metabolismo dos insetos e microrganismos associados (FARONI, 1998), conseqüentemente, eleva o consumo de componentes orgânicos dos grãos e provoca deterioração. Segundo Ferrari Filho *et al.* (2011), o consumo de componentes orgânicos pelo metabolismo dos grãos e microrganismos associados gera aumento do teor de cinzas dos grãos durante o armazenamento. No milho armazenado em espigas o conteúdo de cinzas oscilou bastante ao longo do tempo, estando maior entre os diferentes tipos de acondicionamentos testados no início, aos 3 e 9 meses.

Tabela 3 Percentagem média ⁽²⁾ de cinzas* dos grãos de milho submetidos a diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses

Tempo (meses)	Formas de Armazenagem			
	Sacaria	Hermética	Silo	Espiga
2B688RR				
0	0,82±0,05 ^{Cb}	0,82±0,05 ^{Cb}	0,82±0,05 ^{Db}	1,08±0,14 ^{Ca}
3	0,89±0,05 ^{Cc}	1,21±0,07 ^{Bb}	1,07±0,05 ^{Cb}	1,50±0,16 ^{Aa}
6	1,25±0,06 ^{Ab}	1,46±0,06 ^{Aa}	1,25±0,12 ^{ABb}	1,31±0,05 ^{Bb}
9	1,09±0,02 ^{Bb}	1,10±0,01 ^{Bb}	1,10±0,02 ^{BCb}	1,30±0,08 ^{Ba}
12	1,20±0,04 ^{ABab}	1,10±0,07 ^{Bab}	1,30±0,05 ^{Aa}	1,07±0,10 ^{Cb}
CV(%)= 5,83				
30K73Hx				
0	1,03±0,15 ^{Ba}	1,03±0,15 ^{Ba}	1,03±0,15 ^{Aba}	0,71±0,12 ^{Cb}
3	0,86±0,07 ^{Cc}	1,09±0,09 ^{Ba}	0,92±0,03 ^{Bbc}	1,02A±0,06 ^{ABab}
6	1,10±0,02 ^{ABb}	1,33±0,08 ^{Aa}	1,14±0,02 ^{Ab}	1,14±0,05 ^{Ab}
9	1,23±0,04 ^{Aa}	1,06±0,03 ^{Bb}	1,14±0,14 ^{Aab}	0,91±0,02 ^{Bc}
12	1,15±0,01 ^{Aba}	1,11±0,01 ^{Bab}	0,99±0,03 ^{Bb}	1,00±0,12 ^{Bb}
CV(%)= 5,48				

Notas: ⁽²⁾Valores médios de três repetições. ± seguido pelo desvio padrão da média. Médias seguidas de letras distintas, minúscula na linha e maiúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. CV(%): coeficiente de variação.* Percentagem em base seca.

Os grãos do híbrido de milho 30K73Hx acondicionados em sacarias aumentaram o conteúdo de cinzas com o tempo de armazenagem, já nas espigas e no silo estes conteúdos oscilaram bastante. No silo houve redução aos 3 meses, seguido de aumento a partir dos 6 meses, com nova redução aos 12 meses. Nas espigas houve aumento dos 3 aos 6 meses, com redução aos 9 meses. Na armazenagem hermética o comportamento do conteúdo de cinzas dos grãos foi mais estável, embora tenha tido variabilidade aos 6 meses. Sendo comum, a todos os acondicionamentos de armazenagem dos dois híbridos de milho testados, os grãos apresentarem os maiores conteúdos de cinzas aos 6 meses de armazenagem, conforme relatado acima (janeiro/2013), exceto para o milho acondicionado em sacarias do híbrido 30K73Hx, cujo valor máximo foi aos 9 meses de armazenagem.

Saleemullah *et al.* (2006), comparando o conteúdo de cinzas em grãos de milho armazenados naturalmente e inoculados com *Aspergillus flavus*, observaram 15,4% de aumento do conteúdo de cinzas, durante a armazenagem, nos grãos que continham o inóculo. Ferrari Filho (2011), avaliando a qualidade do milho submetido a diferentes tipos de secagem e armazenado por nove meses observou aumento das cinzas em todos os tratamentos de secagem (1,51-1,99%, 1,51-1,93% e 1,46-2,14%, respectivamente teores iniciais e finais).

5.1.2.3 Conteúdo de lipídios ou extrato etéreo

A percentagem de lipídios dos grãos do híbrido de milho 2B688RR (Tabela 4) oscilou nas sacarias, reduzindo a partir dos 6 meses. No acondicionamento hermético manteve-se constante, teve pouca variação no silo e reduziu a partir dos 3 meses nas espigas. Embora todos os acondicionamentos no início da armazenagem contivessem, estatisticamente, igual conteúdo médio de lipídios nos grãos, as espigas apresentaram sempre os menores teores desde os 6 meses (3,76-2,96%). A redução dos lipídeos dos grãos de milho está relacionada às degradações que ocorrem ao longo da armazenagem por processos bioquímicos como respiração, oxidação e ação de enzimas (RUPOLLO *et al.*, 2004).

Tabela 4 Percentagem média⁽³⁾ de lipídios* dos grãos de milho submetidos a diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses

Tempo (meses)	Formas de Armazenagem			
	Sacaria	Hermética	Silo	Espiga
	2B688RR			
0	3,76±0,27 ^{Ca}	3,76±0,27 ^{Aa}	3,76±0,27 ^{Ba}	3,90±0,38 ^{Ab}
3	4,37±0,17 ^{Ab}	3,96±0,42 ^{Ab}	5,01±0,22 ^{Aa}	4,28±0,25 ^{Ab}
6	4,33±0,15 ^{Ab}	4,18±0,26 ^{Aab}	3,93±0,31 ^{Bab}	3,76±0,25 ^{Bb}
9	3,62±0,26 ^{Cab}	3,85±0,38 ^{Aab}	4,0±0,13 ^{Ba}	3,57±0,10 ^{Bb}
12	3,85±0,13 ^{BCa}	3,95±0,11 ^{Aa}	3,95±0,18 ^{Ba}	2,96±0,05 ^{Cb}
CV(%)= 5,29				
	30K73Hx			
0	5,39±0,90 ^{Aa}	5,39±0,90 ^{Aa}	5,39±0,90 ^{Aa}	4,74±0,16 ^{Cb}
3	5,49±0,43 ^{Aa}	5,30±0,42 ^{Aa}	5,26±0,22 ^{Aa}	5,50±0,31 ^{Ab}
6	5,15±0,18 ^{Abc}	4,79±0,20 ^{Ac}	5,59±0,16 ^{Aab}	5,81±0,70 ^{Aa}
9	5,21±0,23 ^{Aa}	5,28±0,07 ^{Aa}	5,13±0,50 ^{Aa}	4,94±0,10 ^{Ca}
12	4,99±0,14 ^{Aa}	4,85±0,14 ^{Aa}	5,33±0,09 ^{Aa}	5,12±0,23 ^{BCa}
CV= 5,24%				

Notas: ⁽³⁾Valores médios de três repetições. ± seguido pelo desvio padrão da média. Médias seguidas de letras distintas, minúscula na linha e maiúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. CV(%): coeficiente de variação.* Percentagem em base seca.

No híbrido de milho 30K73Hx (Tabela 4), a percentagem de lipídios dos grãos manteve-se constante ao longo do tempo nos acondicionamentos em sacarias, herméticas e silo. Quando armazenados em espigas, apresentaram aumento até os 3 meses e depois redução nos níveis a partir dos 6 meses, embora estes grãos tenham apresentado a menor percentagem inicial de lipídios aos 3, 9 e 12 meses não diferiram em relação aos grãos dos demais acondicionamentos de armazenagem, e juntamente com os grãos do silo apresentaram o maior percentual aos 6 meses (5,81 e 5,59%, respectivamente). Silva (2007a) verificou, em amostras de milho armazenadas em fábricas de rações na Bahia, valores de extrato etéreo entre 1,9 a 5,2%.

Paraginski (2013) não verificou variabilidade significativa dos níveis de lipídios (3,96-4,12%; 3,96-4,09%; 3,96-4,19% e 3,96-4,07%, respectivamente, iniciais e finais) em grãos de milho secos, submetidos a diferentes temperaturas de armazenagem (5, 15, 25 e 35 °C). Jood, Kapoor e Singh (1996) também não verificaram alteração significativa no conteúdo de lipídios, durante 4 meses de armazenagem, em relação ao tratamento controle de grãos de milho infestados por insetos *Rhyzopertha dominicae* e *Trogoderma granarium*.

Schuh *et al.* (2011), avaliando a qualidade físico-química de grãos de milho safrinha 2007, colhidos com teor médio de água 30% e submetidos a dois métodos de secagem, armazenados por seis meses em Eldorado do Sul - RS, constataram redução significativa (-18,36%) do conteúdo de lipídios durante armazenagem, somente nos grãos secos com ar natural variando de 4,14-3,38%, enquanto nos grãos secos com ar natural/GLP (Gás Liquefeito de Petróleo) a variação foi 4,06-3,72%.

A redução dos lipídios nos grãos de milho é um problema na formulação de rações, pois esse componente é mensurado na elaboração de dietas voltadas para o ganho energético de aves poedeiras, gado leiteiro, matrizes e ganho de peso em aves de corte, suínos, equinos, gado de corte, entre outros (ANTUNES *et al.*, 2011).

5.1.2.4 Conteúdo de proteínas

As proteínas e os lipídios são os constituintes do milho mais importantes para a alimentação animal, por isso a preservação dos seus níveis durante o período de armazenagem é de suma importância. Segundo Coradi (2010), as proteínas têm como função a formação e a manutenção dos tecidos, hormônios e enzimas, cujos níveis ingeridos influenciam no ganho de peso e na produção (leite, carne e/ou ovos).

De modo geral, houve significativo aumento no conteúdo de proteínas dos grãos, ao longo da armazenagem, para o milho do híbrido 2B688RR (Tabela 5), em todos os tipos de

acondicionamento, havendo diferença somente entre os diferentes acondicionamentos aos 6 meses, quando as espigas apresentaram o maior percentual (10,49%) de proteínas nos grãos. Segundo Ferrari Filho (2011), o teor de proteínas tende a aumentar com o tempo de armazenagem devido a formação de proteínas fúngicas, que são quantificadas juntamente com a proteína bruta do grão. Para Reed *et al.* (2007), durante a armazenagem ocorre aumento em termos de proporção do conteúdo de proteínas em relação à massa dos grãos, pois esse constituinte não é consumido pelos fungos em suas atividades metabólicas.

No híbrido de milho 30k73Hx, o conteúdo de proteínas dos grãos não apresentou influência significativa da interação tipos e tempos de armazenagem, somente do fator tempo (Tabela 6). Entretanto, apresentou resultados contrários aos do híbrido de milho 2B688RR, isto é, decréscimo do conteúdo de proteínas durante todo período de armazenagem. Saleemullah *et al.* (2006), comparando o conteúdo de proteínas em grãos de milho controle e inoculados com *Aspergillus flavus*, observaram, durante a armazenagem, redução de 8,2% no conteúdo de proteínas dos grãos que continham o inóculo.

Tabela 5 Percentagem média⁽⁴⁾ de proteínas* dos grãos de milho do híbrido 2B688RR submetidos a diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses

Tempo (meses)	Formas de Armazenagem			
	Sacaria	Hermética	Silo	Espiga
0	8,09±0,32 ^{Ba}	8,09±0,32 ^{Ca}	8,09±0,32 ^{Ca}	8,10±0,27 ^{Ca}
3	9,44±0,09 ^{Aa}	9,19±0,25 ^{ABa}	9,00±0,20 ^{ABa}	8,94±0,64 ^{Ba}
6	9,40±0,30 ^{Ab}	9,37±0,22 ^{ABb}	9,62±0,35 ^{Ab}	10,49±0,47 ^{Aa}
9	9,17±0,14 ^{Aa}	9,55±0,61 ^{Aa}	9,11±0,09 ^{ABa}	9,66±0,61 ^{Ba}
12	8,86±0,08 ^{ABa}	8,73±0,19 ^{BCa}	8,63±0,14 ^{BCa}	9,32±0,41 ^{Ba}

CV(%)= 3,75

Notas: ⁽⁴⁾Valores médios de três repetições. ± seguido pelo desvio padrão da média. Médias seguidas de letras distintas, minúscula na linha e maiúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. CV(%): coeficiente de variação.* Percentagem em base seca.

Tabela 6 Percentagem média⁽⁵⁾ de proteínas* dos grãos de milho do híbrido 30k73Hx submetidos a diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses

Tempo (meses)	Proteínas (%)*
0	10,30±0,21 ^a
3	10,00±0,51 ^{ab}
6	9,82±0,59 ^{ab}
9	9,90±0,51 ^{ab}
12	9,74±0,16 ^b

CV(%)= 4,28

Notas: ⁽⁵⁾ Valores médios de quinze repetições, expressos em percentagem. ± seguido pelo desvio padrão da média. Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05). *% em base seca.

5.1.2.5 Percentagem de grãos sem defeito

Os grãos do híbrido de milho 2B688RR apresentaram significativa redução da percentagem de grãos sem defeito, durante o tempo de armazenagem, em todos os acondicionamentos. Nas sacarias e silo a queda é verificada aos 12 meses de armazenagem, 74,53 e 78,56%, respectivamente (Tabela 7), nas bolsas herméticas aos 9 meses (81,61%) e nas espigas desde os 6 meses (90,05%). Sendo que neste último acondicionamento o milho foi armazenado com a melhor percentagem de grãos sem defeito (99,49%), pois a colheita das espigas foi realizada manualmente, enquanto as demais amostras de foram colhidas por colhedora automotriz, fato que propiciou maior índice de danos aos grãos. Entretanto, aos 12 meses de armazenagem não se verifica diferença significativa entre os diferentes acondicionamentos.

Os grãos sem defeito do híbrido de milho 30K73Hx tiveram apenas influência dos fatores tempo de armazenagem e tipo de acondicionamento, individualmente (Tabelas 8 e 9), com significativa redução ao longo do tempo (Tabela 8). Os índices de grãos danificados podem aumentar ao longo da armazenagem, devido à ação de fatores como temperatura ambiente, umidade relativa do ar, teor de água dos grãos, taxa de respiração dos grãos, ataque de insetos, pássaros, ratos e proliferação fúngica (FARONI *et al.*, 2005; FERRARI FILHO, 2011).

Tabela 7 Percentagem média⁽⁶⁾ de grãos sem defeito em amostra do híbrido 2B688RR submetido a diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses

Tempo (meses)	Formas de Armazenagem			
	Sacaria	Hermética	Silo	Espiga
0	90,70±0,62 ^{Ab}	90,70±0,62 ^{Ab}	90,70±0,62 ^{Ab}	99,49±1,18 ^{Aa}
3	88,29±2,81 ^{Aa}	86,04±2,77 ^{Aba}	90,50±3,12 ^{Aa}	92,54±0,40 ^{Aba}
6	87,17±4,79 ^{Aa}	85,59±1,41 ^{Aba}	88,87±1,73 ^{Aa}	90,05±4,36 ^{Ba}
9	84,79±1,90 ^{Aab}	81,61±0,52 ^{Bab}	87,76±0,56 ^{Aa}	81,04±5,50 ^{Cb}
12	74,53±4,99 ^{Ba}	79,85±1,58 ^{Ba}	78,56±2,77 ^{Ba}	80,35±2,87 ^{Ca}
CV(%)= 3,45				

Notas: ⁽⁶⁾ Valores médios de três repetições. ± seguido pelo desvio padrão da média. Médias seguidas de letras distintas, minúscula na linha e maiúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. CV(%): coeficiente de variação.* Percentagem em base seca.

Tabela 8 Percentagem média de grãos sem defeito do híbrido de milho 30K73Hx durante 12 meses de armazenagem⁽⁷⁾

Tempo (meses)	Grãos sem defeito (%)
0	94,26±3,12 ^a
3	88,82±5,36 ^{bc}
6	89,42±4,41 ^b
9	88,93±6,04 ^{bc}
12	86,73±5,30 ^c
CV(%)=1,11	

Notas: ⁽⁷⁾Valores médios de quinze repetições, expressos em percentagem. ± seguido pelo desvio padrão da média. Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 9 Percentagem média de grãos sem defeito⁽⁸⁾ do híbrido de milho 30K73Hx nos diferentes tipos de acondicionamentos de armazenagem

Acondicionamentos de armazenagem	Grãos sem defeito (%)
Sacarias	86,75±3,61 ^b
Hermética	88,18±2,94 ^b
Silo	87,03±3,73 ^b
Espigas	97,28±2,23 ^a
CV(%)=1,11	

Notas: ⁽⁸⁾Valores médios de quinze repetições, expressos em percentagem. ± seguido pelo desvio padrão da média. Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O milho armazenado em espigas (Tabela 9) diferiu dos demais acondicionamentos apresentando o maior percentual de grãos sem defeito. Correlaciona-se esse fato ao tipo de colheita (manual) das amostras, que gera menores danos à integridade física dos grãos como fissuras, trincas e quebras que a colheita mecânica.

Para Bento (2011), a qualidade física dos grãos de milho que inclui os níveis de defeitos é fundamental na valorização ou rejeição do lote, pois estes podem comprometer a qualidade dos subprodutos e rações, facilitando a deterioração, proliferação fúngica e contaminação por micotoxinas.

5.1.2.6 Peso volumétrico ou massa específica ou densidade

Ambos os híbridos de milho apresentaram redução do peso volumétrico, durante a armazenagem em todos os acondicionamentos avaliados (Tabela 10). Contudo, o milho do híbrido 2B688RR acondicionado em bolsas herméticas apresentou os menores índices de perdas no peso volumétrico, durante o tempo de armazenagem, ao se considerar o peso inicial e final, estando entre os acondicionamentos com os maiores valores a partir dos 9 meses de armazenagem.

Enquanto no híbrido de milho 30K73HX, o milho armazenado em espigas apresentou-se durante todo o tempo entre os acondicionamentos com os maiores valores de peso volumétrico. Ferrari Filho (2011) e Schuh *et al.* (2011), indiferentemente do tratamento de secagem utilizado, também constataram perdas significativas no peso volumétrico dos grãos de milho, ao longo da armazenagem.

O peso volumétrico dos grãos está diretamente relacionado à sua integridade e sua redução é concomitante ao grau de deterioração durante a armazenagem (FERRARI FILHO, 2011). Isso pode ser verificado ao inter-relacionar os resultados apresentados nas Tabelas 7 e 8 com os de peso volumétrico (Tabela 10). A redução dos constituintes nutricionais (lipídios, carboidratos, proteínas, vitaminas), gerado pelo metabolismo dos grãos e organismos agregados, durante a armazenagem, causam perdas da matéria orgânica, do peso volumétrico e da matéria seca (FLEURAT-LESSARD, 2002; SCHUH *et al.*, 2011). Para Leal (2012), quanto maior a densidade (peso volumétrico) dos grãos maior o valor nutricional e energético.

Tabela 10 Peso volumétrico dos grãos⁽⁹⁾ de milho (kg m⁻³) submetidos a diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses

Tempo (meses)	Formas de Armazenagem			
	Sacaria	Hermética	Silo	Espiga
2B688RR				
0	908,75±8,92 ^{Aa}	908,75±8,92 ^{Aa}	908,75±8,92 ^{Aa}	897,59±19,50 ^{ABa}
3	862,13±11,94 ^{BCab}	835,77±10,29 ^{Cb}	879,92±12,67 ^{Ba}	881,03±8,32 ^{Ba}
6	883,14±13,23 ^{Bb}	893,12±2,85 ^{Bab}	888,19±10,88 ^{Bab}	901,46±12,65 ^{Aa}
9	885,53±4,71 ^{Bb}	909,64±4,17 ^{Aa}	878,48±3,32 ^{Bb}	881,93±10,76 ^{Bb}
12	837,79±7,16 ^{Cab}	844,98±2,83 ^{Ca}	809,31±3,36 ^{Cb}	831,71±17,58 ^{Cab}
CV(%)= 2,02				
30K73Hx				
0	928,51±5,01 ^{Aa}	928,51±5,01 ^{Aa}	928,51±5,01 ^{Aa}	930,09±6,20 ^{Aa}
3	870,32±8,03 ^{Cb}	848,38±5,50 ^{Dc}	880,67±7,95 ^{Bb}	929,97±9,15 ^{Aa}
6	893,24±6,69 ^{Bb}	902,44±4,05 ^{Bb}	895,25±5,73 ^{Bb}	940,88±15,97 ^{Aa}
9	881,07±6,48 ^{Bcb}	908,40±3,69 ^{Ba}	883,26±9,13 ^{Bb}	893,74±3,62 ^{Bab}
12	850,78±8,99 ^{Db}	866,05±6,48 ^{Cb}	816,92±4,78 ^{Cc}	885,15±11,76 ^{Ba}
CV(%)= 0,80				

Notas: ⁽⁹⁾Médias seguidas de letras distintas, minúscula na linha e maiúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ± seguido pelo desvio padrão da média. CV(%): coeficiente de variação.

Tanto Bento (2011), avaliando a qualidade física de grãos de milho armazenados por até 30 dias em diferentes regiões do Mato Grosso, nas safras 2009 e 2010, quanto Paraginski (2013), avaliando os efeitos da temperatura de armazenamento, durante doze meses, sobre parâmetros de qualidade tecnológica de grãos de milho, verificaram que todas as amostras apresentavam massa específica superior ao padrão 750 kg m⁻³, o que indica

alta qualidade dos grãos. Simioni *et al.* (2010) observam que, embora o peso volumétrico seja utilizado nas indústrias processadoras como um indicador de qualidade e rendimento, esse não é um parâmetro presente nos padrões de classificação e comercialização de milho no Brasil.

Leal (2012) observou que, durante a respiração, os grãos consomem matéria seca, ou seja, no processo respiratório o oxigênio é absorvido e os carboidratos se transformam em gás carbônico, água e calor, conseqüentemente, causando perda de peso dos grãos. Esse processo é conhecido como quebra técnica e ocorre em torno de 0,3% ao mês dos grãos armazenados no Brasil. A temperatura, o teor de água, os insetos e os fungos são os principais agentes influentes na aceleração da respiração dos grãos e, conseqüentemente, influenciam na redução da massa específica dos grãos.

5.1.2.7 Peso de mil grãos

Nos acondicionamentos em sacaria convencional, bolsas herméticas e silo do híbrido de milho 2B688RR não houve alteração significativa do peso de mil grãos ao longo do tempo de armazenagem (Tabela 11). Entretanto, o milho armazenado em espigas reduziu significativamente o peso do 6^o ao 12^o mês (8,17%), variando, respectivamente, de 289,40 a 275,29 g. Embora os grãos de milho das espigas tivessem o maior peso de mil grãos no início da armazenagem, aos 12 meses apresentaram o menor valor em relação aos demais acondicionamentos. Ferrari Filho (2011) também constatou a redução do peso de mil grãos, durante a armazenagem, em dois dos três tratamentos de secagem por ele avaliados, cuja maior variabilidade foi de 292,39 a 276,26 g, respectivamente, no início e fim da armazenagem.

Tabela 11 Peso de mil grãos (g)⁽¹⁰⁾ de milho submetido a diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses

Tempo (meses)	Formas de Armazenagem			
	Sacaria	Hermética	Silo	Espiga
2B688RR				
0	284,95±1,50 ^{Ab}	284,95±1,50 ^{Ab}	284,95±1,50 ^{Ab}	299,78±1,80 ^{Aa}
3	291,23±2,45 ^{Aab}	287,38±0,71 ^{Ab}	290,79±5,58 ^{Aab}	299,66±4,41 ^{Aa}
6	288,85±1,80 ^{Aa}	286,47±3,88 ^{Aa}	291,11±5,14 ^{Aa}	289,40±4,21 ^{Ba}
9	287,79±1,63 ^{Aab}	292,49±3,11 ^{Aa}	287,52±3,07 ^{Aab}	280,79±10,59 ^{Bcb}
12	286,05±3,37 ^{Aa}	290,32±1,53 ^{Aa}	287,95±3,39 ^{Aa}	275,29±9,66 ^{Cb}
CV(%)= 1,50				
30k73Hx				
0	287,00±1,25 ^{Aa}	287,00±1,25 ^{Aa}	287,00±1,25 ^{Ba}	282,00±1,40 ^{CDa}
3	289,83±1,37 ^{Aa}	290,80±0,51 ^{Aa}	291,32±3,02 ^{Aa}	291,81±2,33 ^{Aa}
6	285,48±3,91 ^{Aa}	287,63±3,86 ^{Aa}	287,09±0,54 ^{ABa}	277,32±3,66 ^{Db}
9	287,07±1,61 ^{Aa}	288,21±1,45 ^{Aa}	287,49±2,72 ^{ABa}	288,23±3,11 ^{ABa}
12	289,10±1,99 ^{Aa}	289,65±1,35 ^{Aa}	288,88±0,70 ^{ABa}	287,18±1,37 ^{Bca}
CV= 0,74%				

Notas: ⁽¹⁰⁾Médias seguidas de letras distintas, minúscula na linha e maiúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ± seguido pelo desvio padrão da média. CV(%): coeficiente de variação.

No híbrido de milho 30K73Hx não se verificou alteração significativa do peso de mil grãos, ao longo do tempo de armazenagem, nos acondicionamentos em sacaria convencional e bolsa hermética (Tabela 11). No milho armazenado em espigas, observa-se grande variabilidade e, quando acondicionado em silo, a variação ocorreu somente aos 3 meses. Entre os acondicionamentos, só houve diferença aos 6 meses quando as espigas apresentam os grãos de milho com menor peso.

O peso de mil grãos é um atributo utilizado na avaliação da integridade física dos grãos. Segundo as regras para análise de sementes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009), esse atributo fornece informações sobre o tamanho das sementes, e sobre o estado de maturidade e de sanidade dos grãos. Para Derera *et al.* (2014), a perda de peso dos grãos de milho durante a armazenagem é resultado da infestação por insetos e microrganismos.

5.1.3 Microbiota: perfil geral

Ao analisar a microbiota das amostras de milho procedentes do processo de secagem natural ao sol, considerado o tempo zero de armazenagem (ao todo 12 amostras, 6 por híbrido de milho, sendo 3 de grãos e 3 de espigas), não foi detectada a presença de

Aspergillus sp. em ambos os híbridos, enquanto *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. foram encontrados em todas as amostras (Tabela 12). Almeida, Correa e Mallozzi (2000) avaliando a microbiota fúngica de 3 híbridos de milho recém-colhidos, oriundos de três regiões do Estado de São Paulo, não detectaram a presença de *Aspergillus* sp. nas amostras oriundas de Ribeirão Preto, enquanto os fungos dos gêneros *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. foram diagnosticados em 77,8% e 50% das amostras. Para Coradi (2010), a presença de fungos filamentosos tais como *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. em grãos representa risco de contaminação por micotoxinas.

Rocha (2010), avaliando amostras de milho recém-colhidas, em Santa Maria - RS, detectou *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., respectivamente em 91,3, 19,2 e 9,8%, enquanto em Nova Odessa – SP, nessa mesma ordem 96,2, 15,4% e nd¹¹. Dias (2012), avaliando a qualidade sanitária dos grãos de milho antes da armazenagem constatou a presença de *Fusarium verticillioides* em 100% das amostras e uma baixa incidência de *Aspergillus flavus*.

Ramos (2008), ao avaliar a microflora presente em grãos de milho recém-colhidos de diferentes híbridos, oriundos de diversas zonas macro-climáticas do Brasil, constatou que independente da zona climática, do híbrido e da interação dessas variáveis, os fungos de maior incidência, durante a safra verão e safrinha 2007, foram *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp.

Catão *et al.* (2007) constataram diferenças significativas entre dois híbridos de milho na qualidade microbiológica dos grãos, a incidência de *Fusarium* sp. foi respectivamente 73,75 e 98,25% e *Penicillium* sp. 1,5 e 7,25%, não sendo detectado *Aspergillus* sp. Stefanello *et al.* (2012) constataram diferenças na incidência de *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp. entre três híbridos de milho, e para o último gênero verificaram também diferenças entre as épocas de semeadura, safra de verão e safrinha de inverno.

Conforme relatado pelos diversos autores acima, ocorre variabilidade na incidência de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. nos grãos de milho entre locais, zona climática, safras, híbridos de milho, umidade de colheita, época e densidade de semeadura, também entre outras condições. Isto está atrelado ao fato de que determinadas condições edafoclimáticas favorecem o desenvolvimento e a proliferação de algumas espécies de fungos em detrimento a outras (MARIN *et al.*, 1998c).

¹¹ Não detectado.

Tabela 12 Incidência (%) e contagem (UFC g⁻¹) de bolores nos grãos de milho dos híbridos 2B688RR e 30K73Hx após a secagem (início da armazenagem) e durante os 12 meses de armazenagem

Fungos	Híbrido 2B688RR			Híbrido 30K73Hx		
	Contagem (UFC g ⁻¹)		Incidência (%)	Contagem (UFC g ⁻¹)		Incidência (%)
	Mínimo	Máximo		Mínimo	Máximo	
Após a secagem (início da Armazenagem)						
<i>Aspergillus</i> sp.	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium</i> sp.	-	5,29 x10 ⁴	100	-	6,65 x10 ³	100
<i>Penicillium</i> sp.	-	1,70 x10 ⁴	100	-	7,12 x10 ³	100
Total ⁽¹¹⁾	1,66 x10 ⁵	2,45 x10 ⁵	100	1,63 x10 ⁴	2,28 x10 ⁵	100
Durante os 12 meses de armazenagem						
<i>Aspergillus</i> sp.	-	1,25 x10 ³	18,52	-	5 x10 ³	22,22
<i>Fusarium</i> sp.	-	5,95 x10 ⁵	96,30	-	5,91 x10 ⁴	75,93
<i>Penicillium</i> sp.	-	1,71 x10 ⁵	94,44	-	7,72 x10 ⁴	94,44
Total ⁽¹¹⁾	1 x10 ²	6,45 x10 ⁵	100	4,5 x10	3,49 x10 ⁵	100

Nota: ⁽¹¹⁾ Contagem total de bolores e leveduras.

Nas amostras de milho analisadas, do início da armazenagem até os 12 meses, ao todo 108, sendo 54 amostras de cada híbrido, constatou-se a presença de fungos dos gêneros *Penicillium*, *Fusarium* e *Aspergillus* em ambos os híbridos (Tabela 12). O milho do híbrido 2B688RR obteve níveis maiores de contagem total de bolores e leveduras que o milho do híbrido 30K73Hx (6,45 x10⁵ a 3,49 x10⁵ UFC g⁻¹), e de ocorrência e contagem de *Fusarium* sp. (96,30 a 75,93% e 5,91 x10⁴ a 5,95 x10⁵ UFC g⁻¹), enquanto a incidência e a contagem de *Aspergillus* sp. foram maiores no híbrido de milho 30k73Hx (respectivamente 22,22 a 18,52% e 5 x10³ a 1,25 x10³ UFC g⁻¹). Embora a ocorrência de *Penicillium* sp. nas amostras represente 94,44%, para ambos os híbridos, a contagem foi maior no híbrido de milho 2B688RR (1,71 x10⁵ a 7,72 x10⁴ UFC g⁻¹). Também para Ramos (2008), o gênero mais incidente nos grãos de milho foi *Penicillium* sp.

Na avaliação da qualidade física e sanitária de grãos de milho, armazenados por até 30 dias em diferentes regiões do Estado do Mato Grosso, nas safras 2009 e 2010, Bento (2011) analisou 126 amostras da primeira safra e 90 da segunda, encontrando predominância dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* em média em 39,53, 17,57 e 19,15% das amostras da safra 2009 e 7,80, 2,76 e 2,10% da safra 2010. Silva (2007b), analisando o efeito do tempo entre a colheita e a pré-secagem na incidência fúngica e na contaminação por micotoxinas, em 870 amostras de milho do norte do Estado do Paraná, coletadas na recepção e após pré-secagem, encontrou respectivamente nestas etapas *Aspergillus* sp. em 6 e 15%, *Penicillium* sp. em 90 e 95% e *Fusarium* sp. em 100% das amostras.

Observa-se na Tabela 12, em relação à contagem máxima de todos os gêneros um aumento dos níveis, do início da armazenagem aos 12 meses, para ambos os híbridos de

milho. Embora o percentual de incidência nas amostras tenha diminuído para os gêneros *Fusarium* e *Penicillium* e aumentado para *Aspergillus* sp., esse cenário está relacionado à classificação desses gêneros em fungos de campo (*Fusarium* sp.) e fungos de armazenagem (*Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp.). Entretanto, essa separação não é absoluta por se verificar a incidência *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. em ambas as etapas de produção (SCUSSEL, 2002).

Apesar de estes três gêneros serem os que mais acometem os grãos de milho, da lavoura até a armazenagem (DILKIN *et al.*, 2000; HERMANNNS *et al.*, 2006; LAMBONI; HELL, 2009; MARQUES *et al.*, 2009; BENTO *et al.*, 2012; DIAS, 2012; MOHALE *et al.* 2013), a espécie *Fusarium verticillioides* é predominante no milho recém-colhido (ONO *et al.*, 2006; ROCHA, 2010). Segundo Tédihou *et al.* (2012), sua alta incidência pode restringir o desenvolvimento do gênero *Aspergillus* pela competição entre espécies.

Complexas interações entre atividade de água, temperatura e composição do substrato podem definir quais espécies prevalecem em meio ao ecossistema dos grãos (MARIN *et al.*, 1998a). Entretanto, elevada atividade de água (0,98) e temperatura amena (em torno de 15 °C) favorecem as espécies *Fusarium*, elevando a sua capacidade competitiva em detrimento das espécies *Aspergillus* sp (ATAYDE, 2013). Marin *et al.* (1998b) descrevem que espécies de *Fusarium* são capazes de colonizar rapidamente grãos danificados, reduzindo a fonte de nutrientes disponível a outros fungos, como o *Aspergillus flavus* e interferindo na produção de aflatoxinas.

Para Lillehoj *et al.* (1982), *F. verticillioides* e *A. flavus* possuem uma relação de antagonismo passivo de forte competição, de modo que a espécie dominante será a que estiver em maior número, melhor adaptada ao substrato e às condições ambientais podendo inibir o desenvolvimento da outra. Agregando essas informações aos resultados da Tabela 12 e ao fato de o gênero *Fusarium* adaptar-se melhor ao clima frio que o *Aspergillus* sp., pode-se inferir que a baixa incidência deste último, neste experimento (armazenagem de inverno), está relacionada à competição entre as espécies.

Ainda, segundo Coradi (2010), a alta infecção por *Fusarium* sp., em milho armazenado, está relacionada à baixa qualidade dos grãos desde a colheita, pelos elevados índices de grãos avariados (quebrados, trincados, ardidos, carunchados, mofados, brotados, trincados), cujos fatores causadores são as precipitações pluviométricas de grande intensidade, associadas a altas temperaturas do ar, ataques de insetos durante o cultivo, retardamento da colheita e a regulação inadequada das colheitadeiras que aumentam os danos nos grãos.

A seguir, nas figuras 8-13 estão representados os resultados médios de contagem de *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e o total de bolores e leveduras em ambos os híbridos de milho, nos diferentes acondicionamentos de armazenagem.

5.1.3.1 *Aspergillus* sp. nos diferentes acondicionamentos de armazenagem

O gênero *Aspergillus* foi encontrado em 22 das 108 amostras analisadas neste experimento de armazenagem. Sendo, 18,52% no híbrido de milho 2B688RR e 22,22% no híbrido de milho 30K73Hx. No primeiro, a presença foi maior nos acondicionamentos em sacarias convencionais e bolsas herméticas, 20% das amostras destes, e menor nos silos e nas espigas, 13,33% das amostras. No segundo, a presença do fungo foi, respectivamente, 26,67, 20, 20 e 13,33%, nos acondicionamentos em sacarias convencionais, bolsas herméticas, espigas e silo.

Apesar da grande variabilidade na contagem de *Aspergillus* sp. (Figuras 8 (a) e (b)), não se constatou diferença estatística significativa entre os tratamentos analisados ($p > 0,05$ pelo teste Kruskal-Wallis), para ambos os híbridos de milho, isto é, não houve influência da interação tipo de acondicionamento e tempo de armazenagem e nem mesmo dos fatores individualmente. Ferrari Filho (2011) também não constatou diferença significativa na incidência de *Aspergillus* sp. ao longo do tempo de armazenagem, em grãos milho secos naturalmente ao sol e armazenados durante 9 meses em silo de concreto.

Antonello *et al.* (2009), observando a incidência de *Aspergillus* sp. em grãos de milho armazenados em garrafas tipo PET e sacos de algodão, perceberam uma pequena incidência inicial (2%) do fungo nas embalagens plásticas, com o acréscimo durante armazenagem chegando aos 46% no quarto mês, ao passo que nos sacos de algodão não foi possível verificar um padrão de comportamento para a incidência deste fungo durante a armazenagem.

Ao observar as figuras 8 (a) e (b) nota-se que esse fungo foi detectado somente aos 3 meses de armazenagem, apresentando um progressivo aumento até os 9 meses no híbrido de milho 2B688RR e até 6 meses no híbrido de milho 30K73Hx. O acréscimo na contagem de colônias, aos 6 meses de armazenagem (jan/2012), em ambos os híbridos, pode ser atribuído às condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento. Pois se registraram na estação meteorológica do *campus*, no período dos 4 aos 7 meses de armazenagem, as condições referenciadas por alguns autores (DILKIN *et al.*, 2000; BENTO, 2011) como ótimas, tanto para o crescimento micelial quanto para a germinação de esporos desse gênero. As médias mensais de temperatura e UR registradas de nov/2012 à fev/2013 foram, respectivamente, 23,6 °C e 66,8%; 24,3 °C e 80,6%; 23,2 °C e 71,9%; 23 °C e 79,6%.

Esses resultados corroboram com Cruz (2010) que observa que a contaminação de grãos de milho por *Aspergillus* sp. é favorecida por temperaturas entre 23-26 °C e UR≥75%, ressaltando que temperaturas acima de 27 °C e UR≥85% propiciam a produção de aflatoxinas.

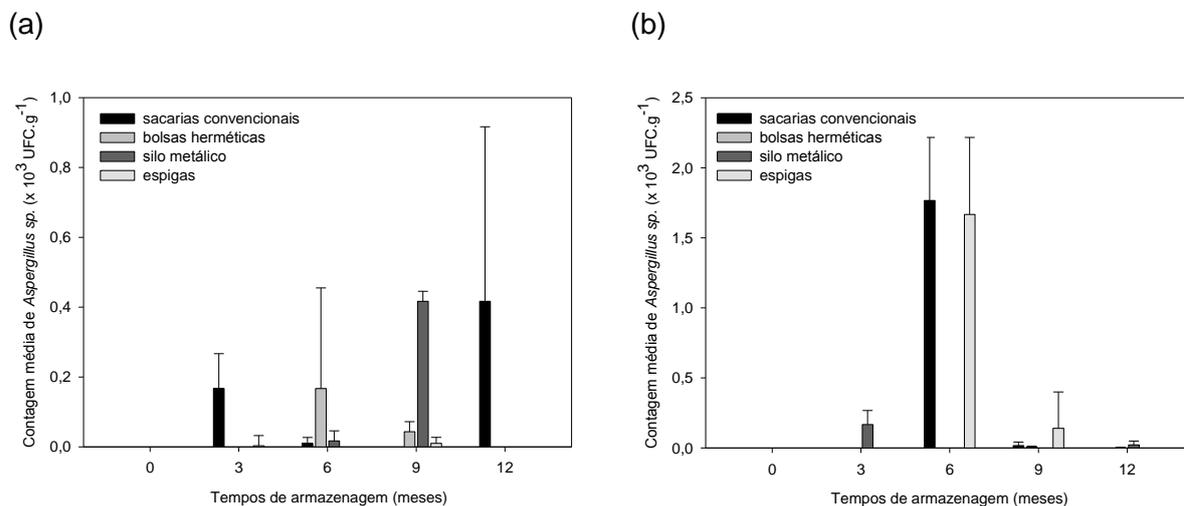


Figura 8 Contagem média de colônias *Aspergillus* sp. ($\times 10^3$ UFC g^{-1}) no milho do armazenamento safra de inverno, em diferentes acondicionamentos e tempos de armazenagem para os híbridos de milho: (a) 2B688RR (b) 30K73Hx.

5.1.3.2 *Fusarium* sp. nos diferentes acondicionamentos de armazenagem

A presença do gênero *Fusarium* foi constatada em 93 das 108 amostras analisadas neste experimento de armazenagem. Em 96,30% das amostras do híbrido de milho 2B688RR e 75,93% do híbrido de milho 30K73Hx. No primeiro, verificou-se a presença deste em 93,33% das amostras das sacarias convencionais e das espigas e, em 100% das amostras dos demais acondicionamentos; No segundo, a presença do fungo foi 86,67, 73,33, 80 e 73,33%, respectivamente, nos acondicionamentos em sacarias convencionais, bolsas herméticas, espigas e silo.

Contudo, a contagem de *Fusarium* sp. não foi influenciada ($p > 0,05$) pela interação tipos de acondicionamento e tempos de armazenagem, somente pelo fator tempo ($p < 0,05$) nos dois híbridos de milho (Figuras 9 (a) e (b)). Verifica-se em ambos os híbridos de milho uma redução na ocorrência desse gênero fúngico, após os 6 meses de armazenagem, o que já era esperado, pois é classificado como fungo de campo, cuja incidência e proliferação demanda grãos com alto teor de umidade, acondicionados em ambientes com umidade relativa do ar entre 70-90% (NOGAIM, 2012).

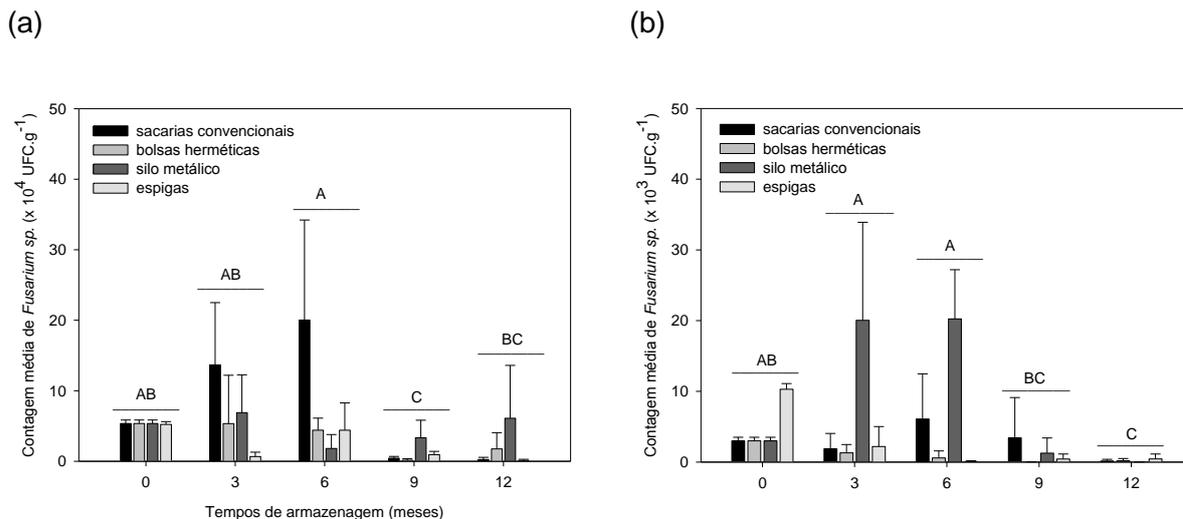


Figura 9 Contagem média de colônias *Fusarium* sp. no milho do armazenamento safra de inverno, em diferentes acondicionamentos e tempos de armazenagem para os híbridos de milho: (a) 2B688RR ($\times 10^4$ UFC g^{-1}) (b) 30K73Hx ($\times 10^3$ UFC g^{-1}).

Nota: Letras maiúsculas distintas entre os tempos de armazenagem denotam diferenças entre estes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A redução da ocorrência de *Fusarium* sp. pode estar atrelada à competição entre as espécies, pois aos 6 meses o híbrido 30K73Hx (Figura 8 (b)) apresentou maior incidência de *Aspergillus* sp., enquanto no híbrido 2B688RR ocorreu entre os 6 e 9 meses (Figura 8 (a)).

A competição entre espécies, aliada a condições ambientais propícias, favorecem o desenvolvimento de algumas, inibindo o de outras (MARIN *et al.*, 1998a). Para Figueira *et al.* (2003), a interação entre espécies da microflora de grãos diminui a colonização de *Fusarium* sp. com o tempo de armazenagem, em diferentes temperaturas e a_w . Segundo Deacon *et al.* (1984), *F. verticillioides* e *A. flavus* são grandes competidores, tanto por espaço quanto por nutrientes. Rocha (2010) também constatou correlação negativa moderada ($r = -0,61$) entre o crescimento de *Fusarium* sp. e *Aspergillus* sp., observando que o crescimento de um gênero varia inversamente em função do crescimento do outro.

Santin *et al.* (2009), avaliando a qualidade microbiológica de grãos de milho secos com ar natural forçado e armazenados em três silos de alambrado por 206 dias, também constataram que a incidência de fungos do gênero *Fusarium* (*F. verticillioides* e *F. graminearum*) foi reduzindo a partir da colheita e durante o período de armazenamento, tendo perda de viabilidade do inóculo aos 112 dias após a colheita.

5.1.3.3 *Penicillium* sp. nos diferentes acondicionamentos de armazenagem

Verificou-se a presença de *Penicillium* sp. em 94,44% das amostras de ambos os híbridos de milho, isto é, em 102 amostras deste experimento. No híbrido de milho 2B688RR respectivamente em 100% das amostras acondicionadas em sacarias convencionais e em espigas, 93,33% das amostras em bolsas herméticas e 86,67% em silo. Enquanto no híbrido de milho 30K73Hx em 100% das amostras armazenadas em espigas e em 93,33% das amostras dos demais acondicionamentos de armazenagem.

No híbrido de milho 2B688RR a contagem de *Penicillium* sp. (Figura 10 (a)) não foi influenciada ($p > 0,05$) pela interação tipo de acondicionamento e tempo de armazenagem, somente pelo fator tipo de acondicionamento ($p < 0,05$). As armazenagens em espigas e as sacarias convencionais apresentaram as maiores contagens de *Penicillium* sp. Apesar de não haver diferença significativa na incidência deste gênero entre os tempos de armazenagem, observa-se especialmente para o milho armazenado em espigas maior incidência entre 3 e 9 meses, justamente entre outubro e abril, meses em que foram registradas as maiores temperatura do ar (Figura 6 a)

No híbrido de milho 30K73Hx a contagem de *Penicillium* sp foi influenciada ($p < 0,05$) pela interação tipo de acondicionamento e tempo de armazenagem (Figura 10 (b)). Mantendo-se estável durante a armazenagem no acondicionamento em sacarias convencionais, reduzindo nos acondicionamentos em silo metálico e nas bolsas herméticas (exceto aos 9 meses). No milho armazenado em espigas ocorreu redução aos 3 meses e, em seguida, aumento, de modo que, aos 12 meses de armazenagem, esse acondicionamento apresentou a maior contagem de *Penicillium* sp.

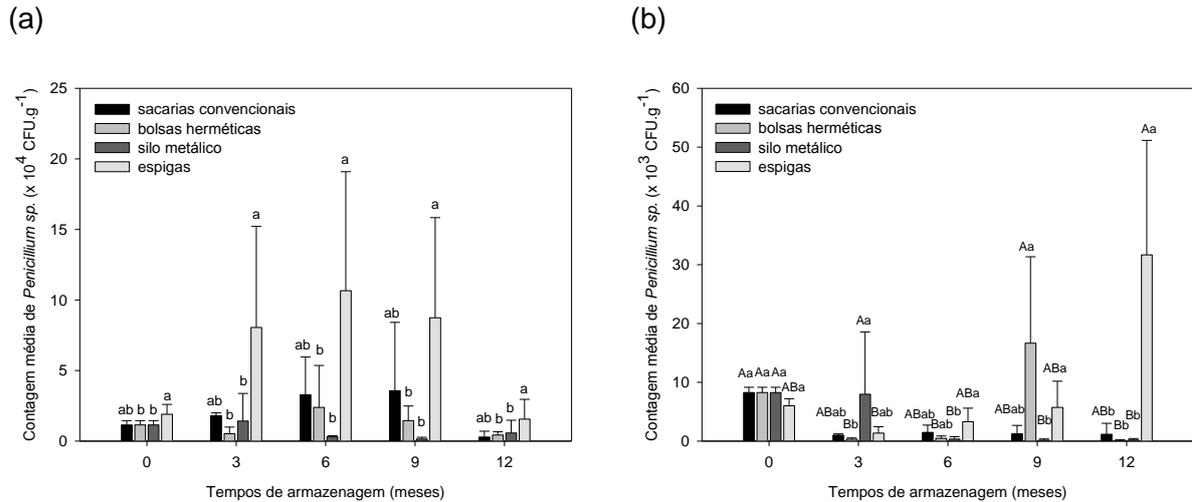


Figura 10 Contagem média de colônias *Penicillium* sp. no milho do armazenamento safra de inverno, em diferentes acondicionamentos e tempos de armazenamento para os híbridos de milho: (a) 2B688RR ($\times 10^4$ UFC g⁻¹) (b) 30K73Hx ($\times 10^3$ UFC g⁻¹).

Nota: Letras distintas, minúscula entre formas de armazenamento dentro cada tempo e maiúsculas entre tempos dentro as formas de armazenamento, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ferrari Filho (2011) constatou, no seu experimento de 9 meses de armazenamento, com grãos de milho secos ao sol, que a incidência de fungos do gênero *Penicillium* sp. reduziu a partir dos 6 meses, resultados que corroboram os obtidos por Antonello *et al.* (2009). Para estes autores a redução da incidência de *Penicillium* sp., durante a armazenagem, verificada nas embalagens plásticas (PET), está relacionada ao aumento da incidência de *Aspergillus* sp., sendo justificada pela competição entre espécies pelo mesmo substrato nutricional.

5.1.3.4 Contagem total de bolores e leveduras nos diferentes acondicionamentos de armazenagem

Embora a contagem de bolores e leveduras tenha sido verificada em 100% das amostras analisadas, variando de $4,5 \times 10^4$ a $3,49 \times 10^5$ UFC g⁻¹ no híbrido de milho 30k73Hx e de 1×10^2 a $6,45 \times 10^5$ UFC g⁻¹ no híbrido de milho 2B688RR, essa contagem não foi influenciada ($p > 0,05$) pela interação tipos de acondicionamento e tempos de armazenagem no híbrido de milho 2B688RR, somente pelo fator tempo de armazenagem ($p < 0,05$), Figura 11 (a), reduzindo significativamente com o passar do tempo.

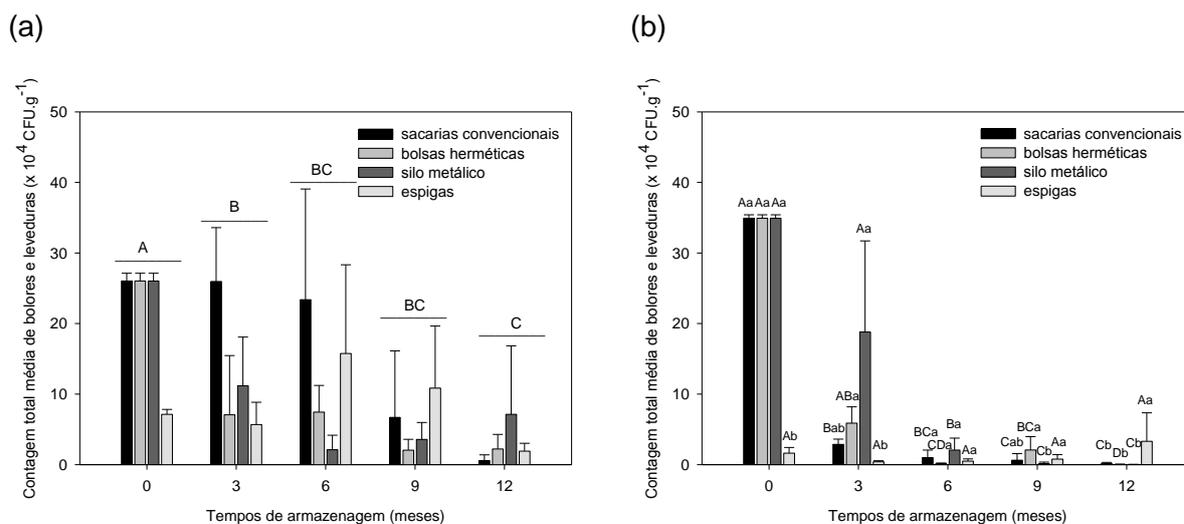


Figura 11 Contagem média de bolores e leveduras ($\times 10^4$ UFC g^{-1}) no milho do armazenamento safra de inverno, em diferentes acondicionamentos e tempos de armazenagem para os híbridos de milho: (a) 2B688RR (b) 30K73Hx.

Nota: Letras distintas, minúscula entre formas de armazenagem dentre cada tempo e maiúsculas entre tempos dentre as formas de armazenagem, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No híbrido de milho 30k73Hx a contagem total de bolores e leveduras foi influenciada ($p < 0,05$) pela interação tipos de acondicionamento e tempos de armazenagem (Figura 11 (b)), diminuindo ao longo do tempo nos acondicionamentos em bolsas herméticas e silo e se mantendo nas armazenagens em sacarias convencionais e espigas. Apesar de, este último acondicionamento apresentar a menor contagem inicial de bolores e leveduras em relação aos demais, aos 12 meses apresentou a maior contagem.

Nogaim (2012) avaliando 30 amostras de grãos de milho coletadas no Ibb (Yemen), obteve na contagem total de bolores das amostras uma variação de $5,2 \times 10^4$ a 3×10^5 UFC g^{-1} . Os gêneros fúngicos mais frequentes encontrados nas amostras foram *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Rhizopus*, respectivamente em 26,1, 35,11, 24,3 e 14,5%.

5.1.4 Ocorrência de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂)

Em virtude de as amostras de milho armazenado não terem sido submetidas a qualquer processo físico-químico, que pudesse degradar os fungos e as micotoxinas presentes, somente se avaliou a ocorrência de aflatoxinas nas 22 amostras que continham colônias do possível agente produtor *Aspergillus* sp. Segundo Scussel (2002), a presença

de fungos com potencial toxigênico nos grãos não garante a contaminação por micotoxinas, mas fornece a possibilidade, assim como, subprodutos e derivados processados ou que passaram por algum tratamento termoquímico podem estar infectados pelas aflatoxinas e não apresentarem incidência do fungo produtor.

A presença de *Aspergillus* sp. em milho, referenciado por muitos pesquisadores como alimento suscetível à contaminação por aflatoxinas, representa um risco potencial à segurança alimentar, logo as determinações analíticas são imprescindíveis para estudo, monitoramento e fiscalização (SILVA, 2007a).

As curvas de calibração construídas com as soluções de trabalho de todos os compostos (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) apresentaram linearidade, visto que $R^2 \geq 0,99$ para todas as curvas. Os limites de detecção obtidos na análise de aflatoxinas foram $1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ para B_2 e $0,50 \mu\text{g kg}^{-1}$ para B_1 , G_1 e G_2 . Os coeficientes de recuperação obtidos nas amostras contaminadas foram 70,35, 97,65, 74,45 e 71,4% respectivamente para as aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 e G_2 . Estes níveis de recuperação estão dentro da faixa aceitável (70 a 110%), preconizada pelo regulamento (CE) nº 401/2006 de 23 de fevereiro de 2006, da União Europeia, para recuperação de concentrações de aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 e G_2 entre 1 a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ (JOUE, 2006).

Destas 22 amostras, detectaram-se aflatoxinas em 15 (68,18%), em níveis de 2,87 a $14,45 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Figura 12), respectivamente 53,33 e 46,67% nos híbridos de milho 30K73Hx e 2B688RR. Apesar das aflatoxinas serem detectadas em 68,18% das amostras analisadas, os níveis de contaminação ($B_1+B_2+G_1+G_2$) encontrados foram inferiores ao LMT pela legislação brasileira (ANVISA, 2011) de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ para milhão em grão. Entretanto, para outros países o nível de contaminação encontrado poderia comprometer o consumo de boa parte das amostras de milho analisadas, pois, segundo dados da FAO (2003), outros 54 países possuem $\text{LMT} \leq 15 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Figura 13 (a)) e, ainda, 61 países do mundo regulamentam um LMT para a presença de aflatoxina B_1 (Figura 13 (b)), por serem estas as mais tóxicas do grupo.

O tipo de aflatoxina mais incidente foi a B_2 (Figura 12), sendo detectada em 12 amostras, seguida da G_2 e da B_1 , respectivamente em 5 e 2 amostras. A presença da toxina G_1 não foi detectada em nenhuma das amostras. Para Dilkin *et al.* (2000) e Scussel (2002), a toxicidade do grupo decresce nessa ordem $B_1 > G_1 > B_2 > G_2$, com a proporção de toxicidade 50, 20 e 10% em relação a B_1 . Diante desse quadro, pode-se inferir que os níveis de contaminação encontrados não comprometem o aproveitamento destes grãos no Brasil, primeiro porque os níveis de contaminação ($B_1+B_2+G_1+G_2$) encontrados estão dentro da faixa permitida pela ANVISA (2011) e, segundo, porque o composto de maior virulência (B_1) teve baixa incidência, apenas 13,3% das amostras foi contaminada.

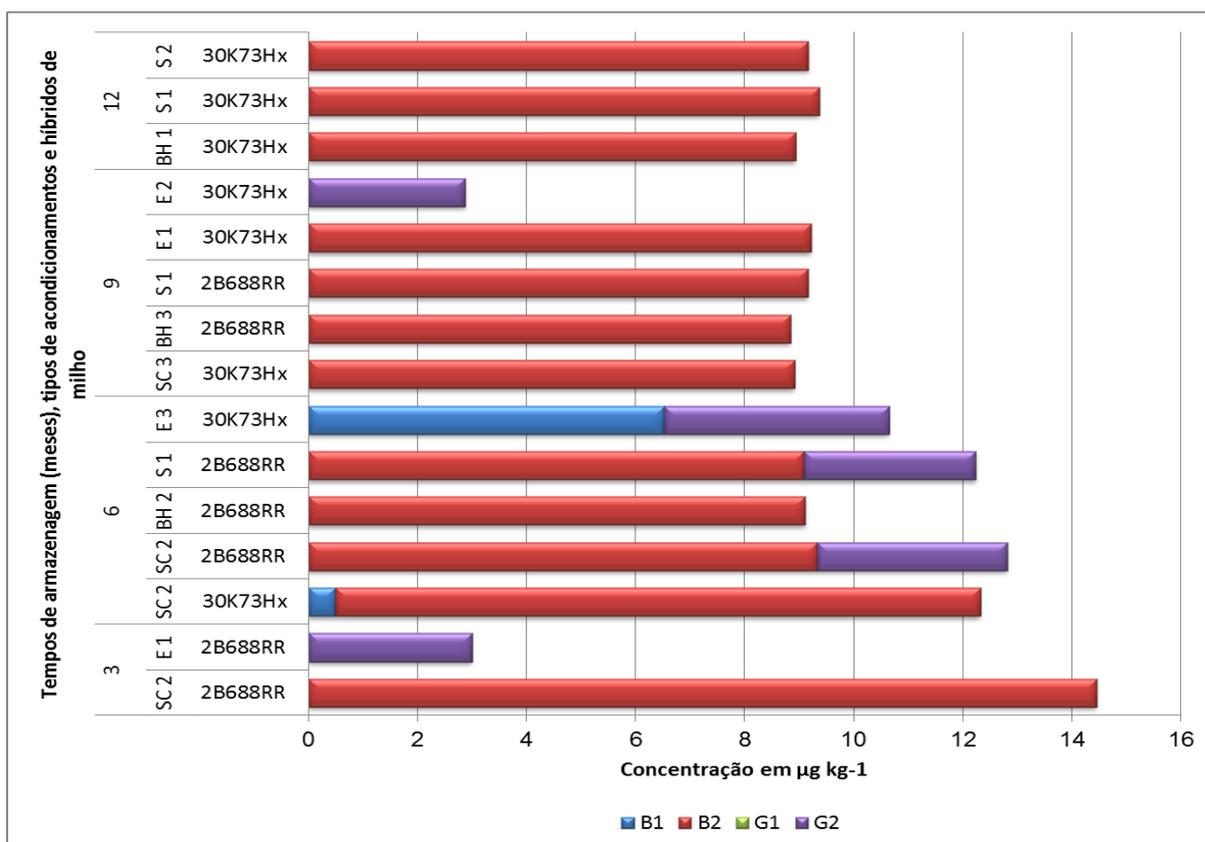


Figura 12 Ocorrência de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) em µg kg⁻¹, nas amostras de milho dos híbridos 2B688RR e 30K73HX, durante o armazenamento safra de inverno nos diferentes acondicionamentos de armazenagem (SC: sacarias convencionais; BH: bolsas hermeticadas; S: silos metálicos; E: espigas), os números (1,2 ou 3) compreendem a repetição do tratamento no respectivo tempo.

Resultados semelhantes foram encontrados por Silva (2007a), avaliando amostras de milho em grão, coletadas em fábricas de ração para aves da Bahia. Ele constatou aflatoxinas em 10% das 80 amostras em níveis de 1 a 5 µg kg⁻¹. Enquanto Moreno (2008) detectou aflatoxinas em 12% das amostras de milho, recém-colhidas na safra 2003, em níveis de 5 a 56 µg kg⁻¹ e, em apenas 4% das amostras da safra 2004, com níveis de 12 a 52 µg kg⁻¹.

Bento (2011) analisando amostras de milho em grão das safras 2009 e 2010, armazenados por até 30 dias em quatro regiões do Mato Grosso, também não constatou, na safra 2009, níveis de contaminação acima do permitido pela ANVISA (2011), para a soma de aflatoxinas (B₁+B₂+G₁+G₂). Já na safra 2010, a ocorrência de aflatoxinas foi detectada somente nas amostras das regiões oeste e leste; na primeira região em níveis abaixo do máximo permitido, enquanto na segunda região, 58,33% das amostras apresentaram-se

acima do limite, em níveis de até $108,7 \mu\text{g kg}^{-1}$, destas amostras 23, 20, 20 e 9% estavam contaminadas, respectivamente com B_1 , B_2 , G_1 e G_2 .

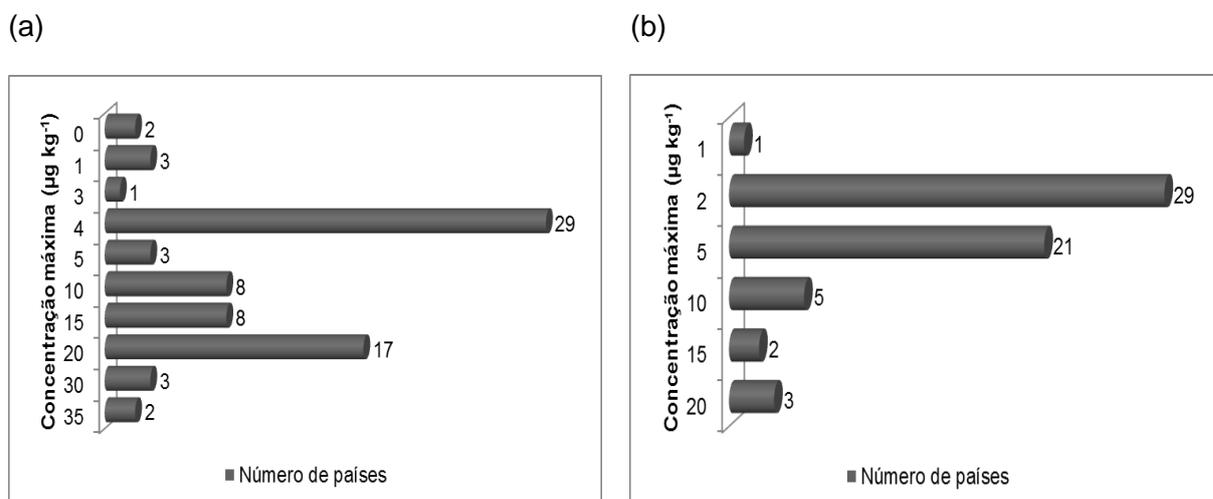


Figura 13 Número de países do mundo com limite máximo de tolerância nos alimentos (a) para a soma das Aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) (b) para Aflatoxina B_1 .

Fonte: FAO (2003).

Na Figura 12, também se verifica que 20% das contaminações por aflatoxinas ocorrem no milho acondicionado em bolsas herméticas e 26,67% em cada um dos demais acondicionamentos. Além disso, 66,66% destas ocorrências (10 amostras) são registradas dos 6 aos 9 meses de armazenagem, coincidentemente nos períodos com as maiores temperaturas médias do ar e UR média acima de 70%, respectivamente $19,2 \text{ }^\circ\text{C}$ e 69,25%, $23,7 \text{ }^\circ\text{C}$ e 73,1%, $21,4 \text{ }^\circ\text{C}$ e 77,27%, $16,2 \text{ }^\circ\text{C}$ e 81,87% para os períodos 0-3 meses, 3-6 meses, 6-9 meses e 9-12 meses. Esses resultados estão relacionados aos obtidos por Travaglia (2011), que observou a produção de aflatoxinas em grãos de milho armazenados, em temperaturas entre $15\text{-}42 \text{ }^\circ\text{C}$, com produção máxima $25\text{-}30 \text{ }^\circ\text{C}$. Para Dilkin *et al.* (2000), a faixa ótima compreende $24\text{-}35 \text{ }^\circ\text{C}$ e UR entre 80-85%.

Nas Figuras 14 (a) e (b) observa-se que, até os 6 meses de armazenagem, 71,43% das amostras contaminadas com aflatoxinas eram do híbrido de milho 2B688RR, enquanto dos 9 aos 12 meses o quadro se inverte e 75% das amostras contaminadas são do híbrido de milho 30K73Hx.

Apesar de se observar grande variabilidade na ocorrência de aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) (Figuras 14 (a) e (b)), não se constataram diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos analisados ($p>0,05$ pelo teste Kruskal-Wallis), em ambos os híbridos de milho, isto é, não houve influência da interação tipo de acondicionamento e tempo de armazenagem e, nem mesmo, desses fatores individualmente.

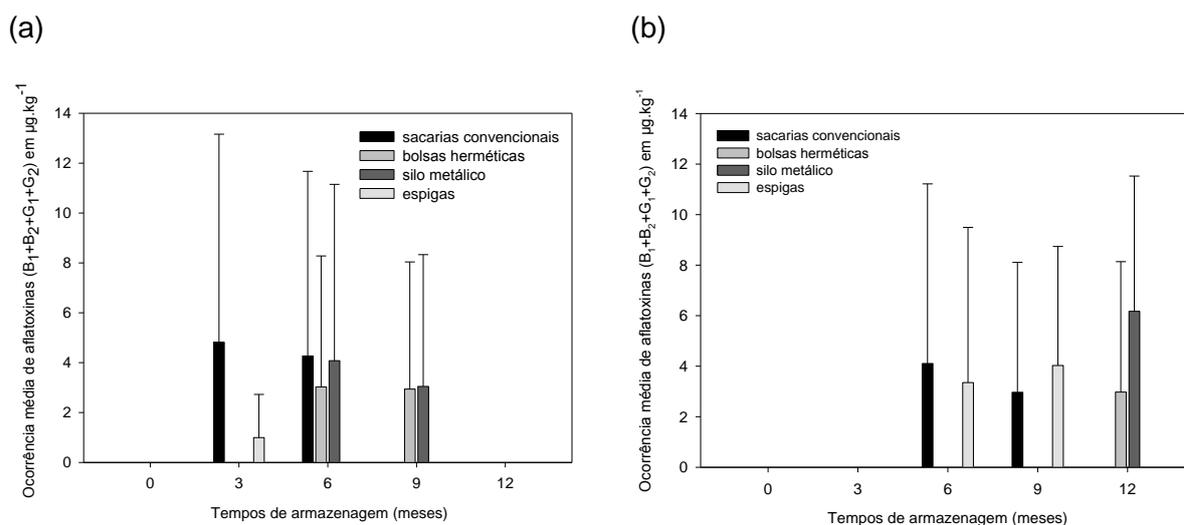


Figura 14 Ocorrência média de aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) no milho durante o armazenamento de inverno, em diferentes acondicionamentos de armazenagem para os híbridos de milho: (a) 2B688RR (b) 30K73Hx.

Embora não tenha sido verificada diferença entre os tipos de acondicionamento avaliados na ocorrência de aflatoxinas, Hell *et al.* (2000), analisando os níveis de contaminação por aflatoxinas em milho armazenado em pequenas propriedades rurais de Benin, oeste da África, concluíram que as boas práticas de armazenagem, juntamente com a conscientização dos produtores em relação ao danos que as aflatoxinas presentes no milho armazenado podem provocar aos humanos e animais, têm grande influência na redução dos níveis de contaminação.

5.1.5 Considerações sobre o armazenamento do milho safra de inverno

O acondicionamento em bolsas herméticas foi o que apresentou grãos com menores teores de água, ao longo do tempo, em ambos os híbridos de milho; ao passo que o milho armazenado em espigas apresentou os maiores teores. Baixos teores de água são importantes para redução da deterioração dos grãos durante o armazenamento, pois diminuem a taxa respiratória dos grãos e limitam a proliferação fúngica (FARONI *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2012).

O milho acondicionado em bolsas herméticas foi estável também para o teor de lipídios, em ambos os híbridos, e ainda para o teor de cinzas no híbrido de milho 30K73Hx. Os teores de lipídios mantiveram-se estáveis com o tempo de armazenagem, no milho acondicionado em sacarias convencionais e nos silos para o híbrido 30K73Hx.

Os lipídios são constituintes essenciais no balanço energético das rações animais, sendo a manutenção desse atributo e do conteúdo de proteínas dos grãos, durante a armazenagem, imprescindível, pois a redução dos seus níveis acarreta o empobrecimento nutricional das rações. Como o aumento do percentual de cinzas, durante a armazenagem, está relacionado à degradação de outros constituintes e, conseqüentemente, da perda de qualidade dos grãos, a estabilidade dos níveis desse atributo é um importante quesito a ser considerado durante a armazenagem.

Nos atributos quantitativos avaliados, porcentagem de grãos sem defeito e peso volumétrico, houve significativas perdas durante o período de armazenagem para todos os acondicionamentos. Enquanto o peso de mil grãos, só teve variabilidade durante a armazenagem no milho armazenado em espigas, cujos piores valores são apresentados no híbrido de milho 2B688RR.

Em relação ao comportamento da microbiota, a contagem de *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e total de bolores e leveduras (no híbrido de milho 2B688RR) não diferiu entre os tipos de acondicionamento analisados. A contagem de *Fusarium* sp. e o total de bolores e leveduras tenderam a diminuir ao longo do tempo de armazenagem, com exceção da contagem total de bolores e leveduras na armazenagem em espigas do híbrido de milho 30k73Hx. A contagem de *Penicillium* sp. nos grãos foi maior na armazenagem em espigas e menor nos acondicionamentos em bolsas herméticas e silos (híbrido de milho 2B688RR) e tendeu a diminuir, com o tempo, nos mesmos acondicionamentos que os do híbrido de milho 30k73Hx.

Em ambos os híbridos de milho, não foi possível verificar influência dos tipos de acondicionamento e tempos de armazenagem na ocorrência de aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) e na incidência do gênero produtor *Aspergillus* sp.

Os níveis de aflatoxinas encontrados estão abaixo do LMT ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$) pela ANVISA (2011) e, ainda, a incidência da aflatoxina B_1 , mais tóxica do grupo foi baixa, indicando que o milho analisado está apto para o consumo, não oferecendo riscos à segurança alimentar, dentro das fronteiras nacionais, contudo, se fosse armazenado para fins de exportação poder-se-ia deparar com transtornos em vários países nos quais os LMT são menores.

5.2 Armazenamento do milho safra de verão

O experimento de armazenagem de verão foi realizado entre fev/2013 e fev/2014, analogamente ao experimento de armazenagem de inverno. Foram avaliados os atributos

de qualidade dos grãos, incidência fúngica e ocorrência de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) nos mesmos dois híbridos de milho (2B688RR, 30K73Hx), com a diferença que estes foram cultivados na safra de verão 2012/2013 e, igualmente, armazenados por doze meses em quatro tipos de acondicionamentos (sacarias convencionais, bolsas herméticas, silos metálicos e espigas). As análises foram realizadas durante a armazenagem em cinco períodos de tempo (inicial, 3, 6, 9 e 12 meses) e os resultados são apresentados a seguir, discutidos separadamente por híbrido, de acordo com o esquema fatorial 4 x 5 (quatro acondicionamentos de armazenagem x cinco tempos de análise).

5.2.1 Condições climáticas durante o experimento de armazenamento do milho safra de verão

As condições climatológicas registradas durante a armazenagem deste experimento são expostas na Figura 6 (b). Durante o período de armazenagem (fev/2013 a fev/2014) a temperatura do ar variou entre -1,8 e 34,8 °C. As maiores temperaturas ocorreram de fev/2013 a mar/2013 e out/2013 a fev/2014, respectivamente no primeiro mês e do oitavo ao décimo segundo mês de armazenagem, com média mensal mínima de 15,5 °C (jul/2013 e ago/2013, respectivamente 5^o e 6^o mês) e máxima de 23,5 °C (dez/2013 e jan/2014, respectivamente 10^o e 11^o mês). A umidade relativa do ar variou entre 20 e 98%, tendo como média mensal mínima 68,2% no 7^o mês de armazenagem (set/2013) e máxima 88,4% no 4^o mês (jun/2013), não estando (a média) acima de 71% apenas em set/2013.

5.2.2 Atributos de qualidade dos grãos de milho armazenados na safra de verão

Para o híbrido de milho 2B688RR, a interação tipo de acondicionamento e tempo de armazenagem teve influência significativa ($p < 0,05$) no teor de água, lipídios, proteínas, percentagem de grãos sem defeito, peso volumétrico e peso de mil grãos (respectivamente, Tabelas 13, 17, 20, 23-25). Enquanto o conteúdo de cinzas foi influenciado ($p < 0,05$) somente pelos fatores individualmente (Tabelas 14 e 15).

Também no híbrido de milho 30K73Hx a interação tipo de acondicionamento e tempo de armazenagem teve influência significativa ($p < 0,05$) no teor de água, cinzas, percentagem de grãos sem defeito, peso volumétrico e peso de mil grãos (Tabelas 13, 16, 23-25). Enquanto para os conteúdos de lipídios e proteínas houve apenas influência individual ($p < 0,05$) dos fatores tipo de acondicionamento e tempo de armazenagem (Tabelas 18, 19, 21 e 22).

5.2.2.1 Teor de água

Percebe-se que o comportamento do teor de água dos grãos de milho do híbrido 2B688RR (Tabela 13) foi estatisticamente igual para os acondicionamentos em sacarias e espigas, apresentando os maiores níveis dos 3 aos 9 meses de armazenagem (maio/2013 a nov/2013), período em que a média de UR foi 75,3%; também nestes acondicionamentos os teores de água foram iguais no início e no fim da armazenagem. O silo apresentou estabilidade até os 6 meses, seguido de aumento; a partir do 9 meses o teor de água dos grãos está acima do preconizado (13%) para um armazenamento seguro (PARAGINSKI, 2013). No acondicionamento hermético ocorreu redução do teor de água dos grãos até 3 meses e, a partir daí, os níveis se estabilizaram, possivelmente porque os grãos atingiram o equilíbrio higroscópico e como, nesse tipo de acondicionamento não há trocas de vapor de água dos grãos com o ambiente (RUPOLLO *et al.*, 2004), a alta UR registrada durante o experimento não apresentou influência nesses grãos. Constata-se que, a partir dos 3 meses, o acondicionamento em bolsas herméticas apresenta sempre os grãos com menores teores de água, enquanto os grãos com maiores teores estão no silo, aos 12 meses de armazenagem.

Alencar *et al.* (2011) avaliando a qualidade do milho infestado por *Sitophilus zeamais*, armazenado por 180 dias em recipientes metálicos (silos), observaram a variação de 12,9-13,6% no teor de água dos grãos isentos de insetos, contudo, independente da presença de infestação não houve variabilidade significativa no teor de água dos grãos.

Verifica-se no híbrido de milho 30K73Hx (Tabela 13) que o comportamento do teor de água dos grãos em todos os acondicionamentos de armazenagem, foi similar ao obtido no híbrido de milho 2B688RR. Pode-se destacar que os maiores teores de água registrados foram aos 6 meses nos acondicionamento em sacarias (12,79%) e em espigas (12,46%). Os grãos acondicionados no silo apresentaram os maiores teores aos 12 meses, como os grãos acondicionados em sacarias: 11,41 e 11,33%, respectivamente. Entretanto, em nenhum período ou tipo de acondicionamento registraram-se teores de água acima de 13%, nesse híbrido de milho. Os grãos acondicionados em bolsas herméticas apresentaram os menores percentuais de teor de água a partir dos 3 meses de armazenagem, sendo que os níveis encontrados (<10%) são os recomendados por Silva (2008), como ideais para manutenção da qualidade de grãos de milho armazenados por períodos superiores a 1 ano.

Para ambos os híbridos de milho, os acondicionamentos em sacarias, espigas e silo aumentaram os níveis do teor de água dos grãos, significativamente, até os 6 meses de armazenagem, nos silos especialmente dos 3 aos 6 meses. Esse fator está relacionado aos elevados registros de UR, cujas médias foram 77,97 e 79,22%, respectivamente entre

0-3 meses e 3-6 meses de armazenagem. Para Faroni (1998), quando a UR excede a faixa 70-75%, pequenos incrementos desta no ar circundante acarretam grandes aumentos no teor de água dos grãos.

Tabela 13 Teor de água (%)⁽¹²⁾ dos grãos de milho submetidos aos diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses

Tempo (meses)	Formas de Armazenagem			
	Sacaria	Hermética	Silo	Espiga
2B688RR				
0	12,09±0,15 ^{Ba}	12,09±0,15 ^{Aa}	12,09±0,15 ^{Ba}	11,35±0,25 ^{Ba}
3	12,64±1,14 ^{ABa}	11±0,08 ^{Bb}	11,94±0,37 ^{Ba}	11,71±0,18 ^{ABab}
6	13,19±0,24 ^{Aa}	11,12±0,28 ^{Bb}	12,71±0,17 ^{ABa}	12,64±0,40 ^{Aa}
9	12,52±0,57 ^{ABab}	11,03±0,23 ^{Bc}	13,3±1,14 ^{Aa}	11,69±0,12 ^{ABbc}
12	11,82±0,12 ^{Bb}	11,27±0,29 ^{ABb}	13,65±0,54 ^{Aa}	11,44±0,33 ^{Bb}
CV(%)= 3,34				
30K73Hx				
0	10,95±0,12 ^{Da}	10,95±0,12 ^{Aa}	10,95±1,12 ^{Ba}	10,50±0,19 ^{Db}
3	11,42±0,05 ^{Cb}	9,75±0,09 ^{Bd}	10,59±0,18 ^{Cc}	11,99±0,35 ^{Ba}
6	12,79±0,19 ^{Aa}	9,57±0,10 ^{Bc}	11,24±0,33 ^{ABb}	12,46±0,06 ^{Aa}
9	11,92±0,02 ^{Ba}	9,6±0,02 ^{Bc}	10,99±0,22 ^{Bb}	11,02±0,07 ^{Cb}
12	11,33±0,11 ^{Cab}	9,69±0,01 ^{Bc}	11,41±0,20 ^{Aa}	11,03±0,15 ^{Cb}
CV(%)=1,38%				

Notas: ⁽¹²⁾ Valores médios de três repetições, expressos em percentagem e base úmida. ± seguido pelo desvio padrão da média. Médias seguidas de letras distintas, minúscula na linha e maiúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. CV(%): coeficiente de variação.

Os resultados obtidos nesta pesquisa, sobre a variabilidade não significativa do teor de água dos grãos, a partir dos 3 meses, nos acondicionamentos em bolsas herméticas, corroboram os obtidos por Costa *et al.* (2010) e Santos *et al.* (2012). Para esses autores, esse resultado já era esperado, pois nesse tipo de acondicionamento não ocorrem trocas da massa de grãos com o ambiente externo e, embora exista respiração dos grãos e microrganismos associados, gerando água durante o consumo de oxigênio, a quantidade produzida é pequena, insuficiente para variar significativamente o teor de água dos grãos.

Ferrari Filho (2011) também constatou aumento do teor de água nos grãos de milho secos ao sol, durante 9 meses de armazenagem em silo de concreto, o teor médio de água inicial era 10,34% e aos 9 meses 13,95%. Enquanto Antunes *et al.* (2011), avaliando os danos físicos e químicos provocados por insetos *Sitophilus zeamais*, em grãos de milho armazenados por 120 dias a 25 ± 5 °C e UR de 60 ± 10%, em frascos de vidro fechados com tecido tipo *voil*, não verificaram variação significativa do teor de água dos grãos com o tempo de armazenagem.

5.2.2.2 Conteúdo de cinzas ou matéria mineral

No conteúdo de cinzas do milho do híbrido 2B688RR somente ocorreram influências ($p < 0,05$) individuais dos fatores, tempo e tipos de acondicionamentos de armazenagem. Percebe-se um aumento progressivo do conteúdo de cinzas durante a armazenagem, em média 24% ao longo dos 12 meses de armazenagem (Tabela 14). Somente os grãos de milho dos acondicionamentos silo e espigas diferiram entre si no conteúdo de cinzas, os grãos do primeiro apresentaram o maior conteúdo e os do segundo o menor (Tabela 15).

Tabela 14 Percentagem média de cinzas do híbrido de milho 2B688RR durante 12 meses de armazenagem⁽¹³⁾

Tempo (meses)	Cinzas (%)
0	1,11±0,06 ^c
3	1,27±0,08 ^b
6	1,26±0,09 ^b
9	1,48±0,18 ^a
12	1,38±0,09 ^{ab}
CV(%) = 7,53	

Notas: ⁽¹³⁾Valores médios de quinze repetições, expressos em percentagem. ± seguido pelo desvio padrão da média. Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). % percentagem em base seca.

Tabela 15 Percentagem média de cinzas do híbrido de milho 2B688RR nas diferentes formas de armazenagem⁽¹⁴⁾

Acondicionamentos de armazenagem	Cinzas (%)
Sacarias	1,31±0,14 ^{ab}
Hermética	1,28±0,10 ^{ab}
Silo	1,36±0,20 ^a
Espigas	1,26±0,19 ^b
CV(%) = 7,53	

Notas: ⁽¹⁴⁾Valores médios de quinze repetições, expressos em percentagem. ± seguido pelo desvio padrão da média. Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). % percentagem em base seca.

Nos acondicionamentos em sacarias, bolsas herméticas e silos os grãos de milho do híbrido 30K73Hx aumentaram significativamente o conteúdo de cinzas durante o tempo de armazenagem (Tabela 16). Nas espigas observa-se variabilidade, mas, apesar disso, ao se comparar a percentagem inicial e final (1,36 e 1,52%), verifica-se um aumento considerável das cinzas. O milho armazenado em espigas apresenta, em todos os tempos analisados, os maiores conteúdos de cinzas.

Tabela 16 Percentagem média⁽¹⁵⁾ de cinzas* dos grãos do híbrido de milho 30K73Hx submetidos a diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses

Tempo (meses)	Formas de Armazenagem			
	Sacaria	Hermética	Silo	Espiga
0	0,98±0,04 ^{Cb}	0,98±0,04 ^{Cb}	0,98±0,04 ^{Db}	1,36±0,08 ^{BCa}
3	1,20±0,03 ^{Ba}	1,02±0,04 ^{Cb}	1,15±0,07 ^{Ca}	1,13±0,07 ^{Da}
6	1,24±0,03 ^{Bb}	1,18±0,06 ^{Bb}	1,20±0,02 ^{BCb}	1,38±0,02 ^{Ba}
9	1,27±0,05 ^{Ba}	1,27±0,07 ^{Ba}	1,25±0,06 ^{Ba}	1,28±0,02 ^{Ca}
12	1,39±0,06 ^{Ab}	1,45±0,01 ^{Aab}	1,41±0,03 ^{Ab}	1,52±0,02 ^{Aa}
CV(%)= 3,35				

Notas: ⁽¹⁵⁾Valores médios de três repetições. ± seguido pelo desvio padrão da média. Médias seguidas de letras distintas, minúscula na linha e maiúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. CV(%): coeficiente de variação.* Percentagem em base seca.

Paraginski (2013), em seu experimento de armazenagem de milho, sob condições controladas de temperatura, em grãos com teor de água inicial de 14%, verificou aumento significativo do teor de matéria mineral dos grãos armazenados a 35 °C por doze meses, cujos conteúdos médios iniciais e finais foram, respectivamente 1,28% e 1,44%. Schuh *et al.* (2011) não verificaram variação significativa do teor de cinzas nos grãos de milho secos por ar natural e/ou gás GLP, durante 6 meses de armazenamento, cujas variações foram 1,26-1,37% e 1,28-1,47%, respectivamente para os métodos de secagem.

O aumento do teor de cinzas dos grãos, durante a armazenagem, está relacionado à degradação da fração orgânica dos grãos, pelas atividades metabólicas destes e dos microrganismos integrados que, durante os processos de respiração e transpiração, metabolizam a matéria orgânica, produzindo gás carbônico, água e calor, podendo transformar estruturalmente a composição mineral e aumentar seu conteúdo (DELIBERALI *et al.*, 2010). Para Dionello *et al.* (2000), quanto menores os incrementos nos conteúdos aparentes de matéria mineral maior é a conservabilidade dos grãos.

5.2.2.3 Conteúdo de lipídios ou extrato etéreo

Os grãos de milho do híbrido 2B688RR, acondicionados em sacarias, bolsas herméticas e espigas (Tabela 17) mantiveram o conteúdo inicial de lipídios até os 3 meses de armazenagem, enquanto os grãos acondicionados no silo tiveram redução desse conteúdo, nesse mesmo período. Dos 3 aos 9 meses de armazenagem os grãos de todos os acondicionamentos de armazenagem apresentaram aumento do conteúdo de lipídios, mas, a partir disso, somente as bolsas herméticas mantiveram os níveis, enquanto os demais reduziram significativamente. De modo geral, os grãos acondicionados em bolsas

herméticas foram os que apresentaram maior estabilidade no conteúdo de lipídios durante a armazenagem.

Para Deliberali *et al.* (2010), os lipídios são os constituintes do grão mais vulneráveis à deterioração durante a armazenagem, sendo que a redução dos níveis desse constituinte está diretamente relacionada à taxa de deterioração dos grãos. A hidrólise dos lipídios, que estão contidos nos grãos na forma de triglicerídeos, para ácidos graxos livres e glicerol é resultante dos processos de respiração do grão, oxidação, ação de enzimas, entre outros (FLEURAT-LESSARD, 2002). Reed *et al.* (2007) acrescentam que, para obtenção de energia, os fungos são potenciais consumidores de lipídios e hidratos de carbono (carboidratos, glicídios ou açúcares) dos grãos de milho.

Tabela 17 Percentagem média⁽¹⁶⁾ de lipídios* dos grãos do híbrido de milho 2B688RR submetidos a diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses

Tempo (meses)	Formas de Armazenagem			
	Sacaria	Hermética	Silo	Espiga
0	3,83±0,15 ^{CDa}	3,83±0,15 ^{BCa}	3,83±0,15 ^{Ca}	3,77±0,20 ^{Ca}
3	3,82±0,16 ^{Da}	3,69±0,11 ^{Cab}	3,60±0,02 ^{Db}	3,77±0,15 ^{Cab}
6	4,10±0,09 ^{BCa}	4,09±0,20 ^{ABa}	4,24±0,07 ^{Ba}	4,36±0,05 ^{Ba}
9	5,02±0,24 ^{Aa}	4,15±0,01 ^{Ab}	4,91±0,26 ^{Aa}	5,03±0,11 ^{Aa}
12	4,18±0,15 ^{Ba}	4,26±0,15 ^{Aa}	3,72±0,05 ^{CDb}	4,38±0,25 ^{Ba}

CV(%) = 2,93

Notas: ⁽¹⁶⁾Valores médios de três repetições. ± seguido pelo desvio padrão da média. Médias seguidas de letras distintas, minúscula na linha e maiúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. CV(%): coeficiente de variação.* Percentagem em base seca.

Ferrari Filho (2012) constatou perdas do teor de extrato etéreo durante a armazenagem de 9 meses, em todos os tratamentos de secagem analisados, cujos teores iniciais e finais por ele encontrados foram, respectivamente, 5,32-4,55%, 5,74-4,48% e 5,63-4,73%. Saleemullah *et al.* (2006), comparando o conteúdo de lipídios em grãos de milho controle e inoculados com *Aspergillus flavus*, observou redução de 41,4% durante a armazenagem nos grãos que continham o inóculo.

No híbrido de milho 30K73Hx não foi verificada influência significativa ($p < 0,05$) da interação tipos de acondicionamentos e tempos de armazenagem no conteúdo de lipídios dos grãos, apenas dos fatores individualmente (Tabelas 18 e 19). Em relação ao tempo de armazenagem (Tabela 18), observa-se que até os 3 meses o conteúdo de lipídios dos grãos de milho permanece igual ao inicial, apresentando um incremento de 6,2% aos 6 meses de armazenagem, e a partir disso os níveis se mantêm até os 12 meses. Em relação aos acondicionamentos de armazenagem (Tabela 19), o conteúdo de lipídios apenas diferem entre os grãos armazenados em espigas e em bolsas herméticas, os grãos do primeiro tipo

de acondicionamento apresentam as maiores porcentagens (5,14%), enquanto os grãos do segundo as menores (4,92%).

Tabela 18 Percentagem média de lipídios do híbrido de milho 30K73Hx durante 12 meses de armazenagem⁽¹⁷⁾

Tempo (meses)	Lipídios (%)
0	4,68±0,16 ^b
3	4,86±0,14 ^b
6	5,16±0,15 ^a
9	5,37±0,41 ^a
12	5,26±0,30 ^a
CV(%) = 2,12	

Notas: ⁽¹⁷⁾Valores médios de quinze repetições, expressos em percentagem. ± seguido pelo desvio padrão da média. Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). % percentagem em base seca.

Tabela 19 Percentagem média de lipídios ⁽¹⁸⁾ do híbrido de milho 30K73Hx nas diferentes formas de armazenagem

Acondicionamentos de armazenagem	Lipídios (%)
Sacarias	5,10±0,34 ^{ab}
Hermética	4,92±0,33 ^b
Silo	5,09±0,33 ^{ab}
Espigas	5,14±0,40 ^a
CV(%) = 2,12	

Notas: ⁽¹⁸⁾Valores médios de quinze repetições, expressos em percentagem. ± seguido pelo desvio padrão da média. Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). % percentagem em base seca.

Para Reed *et al.* (2007), a redução no conteúdo de lipídios dos grãos, durante a armazenagem, indica que o gérmen (83% lipídios) é a parte do grão que está sendo mais consumida, já o aumento de lipídios indica o contrário. Esses autores constataram, em algumas amostras de milho com conteúdo inicial de lipídios 3,25%, decréscimo de 10% no conteúdo com o tempo de armazenagem, enquanto em outras amostras verificaram aumento inferior a 5%. Para eles, a variação dos lipídios foi influenciada pelo teor de água dos grãos, sendo que teores de água elevados (18%) propiciaram redução no conteúdo de lipídios, independentemente do tipo de acondicionamento de armazenagem utilizado.

5.2.2.4 Conteúdo de proteínas

A variação do conteúdo de proteínas dos grãos do híbrido de milho 2B688RR (Tabela 20) não foi significativa, em todos os acondicionamentos durante a armazenagem,

exceto no milho armazenado em espigas que foi menor no início (tempo 0). Somente havendo diferença do conteúdo de proteínas dos grãos entre os tipos de acondicionamentos no início, quando o milho armazenado em espigas apresenta o menor conteúdo, e aos 9 meses entre os grãos acondicionados em espigas e em bolsas herméticas, sendo que o primeiro acondicionamento apresenta os grãos com maior conteúdo de proteínas enquanto o segundo com o menor.

Segundo Paraginski (2013), nem sempre se percebe variabilidade do teor de proteínas durante a armazenagem, porque as alterações dos constituintes do grão ocorrem mais rapidamente nos lipídios, quando comparado ao amido e a proteínas.

Tabela 20 Percentagem média⁽¹⁹⁾ de proteínas* dos grãos do híbrido de milho 2B688RR submetidos a diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses

Tempo (meses)	Formas de Armazenagem			
	Sacaria	Hermética	Silo	Espiga
0	8,68±0,20 ^{Aa}	8,68±0,20 ^{Aa}	8,68±0,20 ^{Aa}	7,78±0,21 ^{Bb}
3	8,48±0,08 ^{Aa}	8,55±0,13 ^{Aa}	8,40±0,11 ^{Aa}	8,64±0,37 ^{Aa}
6	8,52±0,15 ^{Aa}	8,47±0,15 ^{Aa}	8,44±0,16 ^{Aa}	8,61±0,10 ^{Aa}
9	8,65±0,37 ^{Aab}	8,40±0,16 ^{Ab}	8,85±0,48 ^{Aab}	8,93±0,34 ^{Aa}
12	8,62±0,11 ^{Aa}	8,44±0,09 ^{Aa}	8,88±0,23 ^{Aa}	8,74±0,37 ^{Aa}
CV(%) = 2,64				

Notas: ⁽¹⁹⁾Valores médios de três repetições. ± seguido pelo desvio padrão da média. Médias seguidas de letras distintas, minúscula na linha e maiúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. CV(%): coeficiente de variação.* Percentagem em base seca.

Como medidas curativas (aplicação de pastilhas Gastoxin) eram tomadas sempre que detectada a ocorrência de infestações por insetos no milho, pode-se inferir que estas infestações não interferiram no conteúdo de proteínas dos grãos. Matioli e Almeida (1979) observam que o consumo de proteínas por insetos *Sitophilus oryzae* é baixo, pois eles a sintetizam do próprio organismo, a preferência desses insetos é pelos carboidratos do endosperma que proporcionam maior fonte de energia.

No híbrido de milho 30K73Hx não foi verificada influência significativa ($p > 0,05$) da interação tipos de acondicionamentos e tempos de armazenagem no conteúdo de proteínas dos grãos, apenas dos fatores individualmente (Tabelas 21 e 22). Observa-se (Tabela 21) um decréscimo (4,26%) no conteúdo de proteínas dos grãos até os 9 meses de armazenagem, seguido de um aumento (3,67%) que possibilita os mesmos níveis de proteínas nos grãos no início e aos 12 meses de armazenagem. Dionello *et al.* (2000) constataram redução no conteúdo de proteínas dos grãos de milho durante a armazenagem para todos tratamentos de secagem avaliados.

Apesar do endosperma (74% proteínas e 15,4% lipídios) ser o alvo primário dos ataques de insetos, o gérmen é a parte mais consumida, devido à sua alta constituição lipídica (83% lipídios e 26% proteínas). Esse consumo gera redução na proporção de gordura dos grãos, ao mesmo tempo em que ocasiona aumento da fração de proteínas. Outro fator que pode incrementar a fração de proteínas durante a armazenagem é a quantificação das proteínas de insetos e fungos agregada à massa de grãos (ANTUNES *et al.*, 2011).

Tabela 21 Percentagem média de proteínas⁽²⁰⁾ nos grãos do híbrido de milho 30K73Hx durante 12 meses de armazenagem.

Tempo (meses)	Proteínas (%)
0	9,38±0,18 ^a
3	9,16±0,29 ^{bc}
6	9,18±0,33 ^b
9	8,98±0,19 ^c
12	9,31±0,24 ^{ab}
CV(%) = 1,77	

Notas: ⁽²⁰⁾Valores médios de quinze repetições, expressos em percentagem. ± seguido pelo desvio padrão da média. Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05). % percentagem em base seca.

Barney *et al.* (1991), avaliando o conteúdo de proteínas dos grãos de milho, durante a armazenagem, não constataram variabilidade significativa no conteúdo proteico, para as diferentes temperaturas de armazenagem (15, 22, 29 e 36 °C). No entanto, verificaram diferenças entre híbridos, entre presença e ausência de *Sitophilus zeamais* e entre aplicação e não aplicação de inseticida organofosforado (Malathion), constatando maior teor de proteínas nos grãos infestados pelos insetos e não submetidos a aplicações de inseticidas.

Tabela 22 Percentagem média de proteínas⁽²¹⁾ dos grãos do híbrido de milho 30K73Hx nas diferentes formas de armazenagem

Acondicionamentos de armazenagem	Proteínas (%)
Sacarias	9,09±0,20 ^b
Hermética	9,08±0,18 ^b
Silo	9,11±0,15 ^b
Espigas	9,52±0,28 ^a
CV(%) = 1,77	

Notas: ⁽²¹⁾Valores médios de quinze repetições, expressos em percentagem. ± seguido pelo desvio padrão da média. Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05). % percentagem em base seca.

Dentre os acondicionamentos de armazenagem do híbrido de milho 30K73Hx (Tabela 22), o conteúdo de proteínas do milho armazenado em espigas diferiu em relação aos demais apresentando os maiores valores. O fato desse híbrido de milho, armazenado em espigas, apresentar o maior conteúdo de cinzas (Tabela 18) e o maior teor de proteínas durante os 12 meses de armazenagem, pode estar relacionado à taxa maior de degradação dos grãos nesse tipo de acondicionamento de armazenagem. Reed *et al.* (2007) observam que ocorrem incrementos na fração de proteínas dos grãos quando outros constituintes são consumidos.

5.2.2.5 Percentagem de grãos sem defeito

Em todos os tipos de acondicionamento, de ambos os híbridos de milho (Tabela 23), constata-se redução da percentagem de grãos sem defeito durante a armazenagem. Sendo que o acondicionamento em espigas apresentou os maiores valores para esse parâmetro do início ao fim da armazenagem, isso porque a colheita manual das espigas acarreta menor índice de danos aos grãos. Pimentel, Santos e Lorini (2011) enfatizam que na colheita mecânica deve-se primar pela boa regulagem da máquina e treinamento dos operadores, pois os danos mecânicos causados nos grãos durante essa operação causam quebras e trincas, favorecendo a deterioração durante a armazenagem.

No híbrido de milho 2B688RR (Tabela 23), a redução média da percentagem de grãos sem defeito durante os 12 meses de armazenagem foi de 14,3% nas sacarias, 10,6% nas bolsas herméticas, 21,2% nos silos e 8,25% nas espigas. Havendo diferença significativa no índice de defeitos entre o milho armazenado em espigas e nos demais acondicionamentos para todos os tempos de armazenagem, sendo que o milho armazenado em espigas apresentou os maiores índices de grãos sem defeito. Enquanto que aos 12 meses de armazenagem os grãos acondicionados no silo diferiram dos demais, apresentando o menor índice de grãos sem defeito (70,71%), estando abaixo do padrão de comercialização para milho (71%) (BRASIL, 2012).

Paraginski (2013) verificou aumento dos grãos com defeitos durante armazenagem, principalmente após os 6 meses, e, ainda, algumas amostras degradaram tanto que, aos 12 meses de armazenagem, foram classificadas como AP (abaixo do padrão de comercialização).

No híbrido de milho 30k73Hx (Tabela 23), a redução média da percentagem de grãos sem defeito, durante os 12 meses de armazenagem, foi de 9,11% nas sacarias, 10,08% nas bolsas herméticas, 5,26% nos silos e 8,66% nas espigas. Embora o milho armazenado em espigas tenha apresentado os maiores índices de grãos sem defeito, do início aos 12 meses

de armazenagem, o menor percentual de aumento de defeitos ocorreu nos grãos acondicionados no silo. Para Reed *et al.* (2007), a deterioração dos grãos durante a armazenagem, causada por fungos e/ou outros fatores, reduz o valor nutricional e comercial dos grãos, alterando a aparência e os índices de classificação.

Tabela 23 Percentagem média⁽²²⁾ de grãos de milho sem defeitos nos diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses

Tempo (meses)	Formas de Armazenagem			
	Sacaria	Hermética	Silo	Espiga
2B688RR				
0	89,40±0,65 ^{Ab}	89,40±0,65 ^{Ab}	89,40±0,65 ^{Ab}	98,76±0,30 ^{Aa}
3	88,61±0,32 ^{Ab}	84,55±1,33 ^{Bc}	86,15±2,25 ^{Abc}	96,26±0,73 ^{ABa}
6	81,81±1,59 ^{Bb}	80,92±1,35 ^{Cb}	79,48±2,20 ^{Bb}	93,27±1,29 ^{Bca}
9	77,47±0,25 ^{Cb}	79,33±2,35 ^{Cb}	79,06±2,28 ^{Bb}	93,61±2,31 ^{Bca}
12	76,64±1,49 ^{Cc}	79,91±0,90 ^{Cb}	70,71±1,50 ^{Cd}	90,61±2,12 ^{Ca}
CV(%)= 1,70				
30K73Hx				
0	92,38±0,72 ^{Ab}	92,38±0,72 ^{Ab}	92,38±0,72 ^{Ab}	99,60±25 ^{Aa}
3	92,06±1,37 ^{Ab}	91,09±1,14 ^{ABb}	88,18±1,18 ^{Bc}	96,26±0,73 ^{Ba}
6	88,20±2,06 ^{Bb}	89,10±1,00 ^{Bb}	87,83±1,79 ^{BCb}	94,98±1,04 ^{Bca}
9	86,99±1,27 ^{Bbc}	89,11±0,80 ^{Bb}	85,51±1,30 ^{Cc}	93,09±0,85 ^{Cda}
12	83,96±1,19 ^{Cc}	83,06±1,01 ^{Cc}	87,52±1,18 ^{BCb}	90,97±0,90 ^{Da}
CV= 1,21				

Notas: ⁽²²⁾Valores médios de três repetições. ± seguido pelo desvio padrão da média. Médias seguidas de letras distintas, minúscula na linha e maiúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. CV(%): coeficiente de variação.

Caneppele *et al.* (2003) observam que infestações por insetos podem gerar danos irreversíveis à massa de grãos, reduzindo a qualidade dos grãos e, conseqüentemente, gerando depreciação comercial pelas quedas que causam na classificação.

Alencar *et al.* (2011), avaliando a qualidade do milho armazenado em recipientes metálicos (silos) por 180 dias, também constataram aumento significativo nos danos dos grãos durante a armazenagem, sendo que o aumento foi mais acelerado nos recipientes que continham insetos.

5.2.2.6 Peso volumétrico ou massa específica ou densidade

Houve redução do peso volumétrico dos grãos de milho durante a armazenagem, em todos os acondicionamentos de ambos os híbridos (Tabela 24). Entretanto, somente se registrou valor menor que 750 kg m⁻³ aos 12 meses de armazenagem, nos grãos de milho do híbrido 2B688RR acondicionados em silo. Conforme Paraginski (2013), isso indica boa qualidade do milho armazenado nos demais acondicionamentos.

Alencar *et al.* (2011) obtiveram decréscimo significativo da massa específica aparente dos grãos de milho ao longo do período de armazenagem, independente da exposição ou não dos grãos aos insetos-pragas. Para Alves (2004), a perda de massa dos grãos causada pela respiração, durante a armazenagem, é pequena quando confrontada com as perdas ocasionadas por insetos e fungos, contudo, essa perda tem fundamental importância para as unidades armazenadoras, sendo contabilizada como quebra técnica.

Na Tabela 24, pode-se verificar que o milho do híbrido 2B688RR, armazenado em espigas, apresenta o maior peso volumétrico inicial (903,01 kg m⁻³), e que os grãos nesse acondicionamento, juntamente com os grãos das bolsas herméticas, apesar de também apresentarem perdas ao longo do tempo de armazenagem, respectivamente 9,38% e 2,05%, mantiveram-se até os 9 meses com os maiores pesos volumétricos, em relação aos grãos dos demais acondicionamentos. Nos 12 meses de armazenagem, as bolsas herméticas continham os grãos de milho com maior peso (839,49 kg m⁻³) e o silo com menor (728,54 kg m⁻³). Os grãos deste último apresentaram a maior perda de massa durante todo período de armazenagem (14,99%). Os grãos acondicionados em sacarias convencionais apresentaram 6,15% de perda de peso, entre o início e o fim da armazenagem e também sempre estiveram no *ranking* dos menores pesos volumétricos.

Tabela 24 Peso volumétrico dos grãos⁽²³⁾ de milho (kg m⁻³) submetidos a diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses

Tempo (meses)	Formas de Armazenagem			
	Sacaria	Hermética	Silo	Espiga
2B688RR				
0	857,05±6,75 ^{Ab}	857,05±6,75 ^{Ab}	857,05±6,75 ^{Ab}	903,01±2,69 ^{Aa}
3	819,68±11,49 ^{Bb}	858,79±71,02 ^{Aa}	820,08±4,30 ^{Bb}	862,00±7,84 ^{Ba}
6	823,31±14,48 ^{Bb}	830,64±4,94 ^{Bab}	827,90±6,79 ^{Bb}	850,98±11,48 ^{BCa}
9	808,84±6,35 ^{Bb}	832,18±6,48 ^{Ba}	792,10±12,41 ^{Cb}	837,23±7,88 ^{CDa}
12	804,38±3,17 ^{Bb}	839,49±3,58 ^{ABa}	728,54±19,16 ^{Dc}	818,30±7,95 ^{Db}
CV(%)= 1,70				
30K73Hx				
0	918,68±14,44 ^{Ab}	918,68±14,44 ^{Ab}	918,68±14,44 ^{Ab}	952,69±3,14 ^{Aa}
3	867,44±2,78 ^{Bc}	900,92±5,35 ^{ABab}	882,81±6,08 ^{BCbc}	918,25±3,92 ^{Ba}
6	845,08±10,18 ^{Cb}	901,58±6,76 ^{ABa}	897,15±6,15 ^{Ba}	904,3±11,54 ^{BCa}
9	856,44±7,86 ^{Cb}	892,62±1,78 ^{Ba}	878,06±10,04 ^{BCa}	895,99±0,46 ^{CDa}
12	863,05±13,02 ^{BCb}	898,48±12,69 ^{ABa}	873,94±1,73 ^{Cb}	883,41±4,52 ^{Dab}
CV(%)= 0,99				

Notas: ⁽²³⁾Médias seguidas de letras distintas, minúscula na linha e maiúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ± seguido pelo desvio padrão da média. CV(%): coeficiente de variação.

No híbrido de milho 30K73Hx (Tabela 24), também o armazenamento em espigas continha os grãos com os maiores pesos volumétricos do início ao fim da armazenagem, juntamente com os acondicionamentos em bolsas herméticas (dos 3 aos 12 meses) e em silo (dos 6 aos 9 meses). Já os grãos acondicionados em sacarias convencionais apresentaram sempre os menores pesos volumétricos. As perdas de massa específica durante os 12 meses nos acondicionamentos em sacarias, bolsas herméticas, silo e espigas compreenderam, respectivamente, 6,06, 2,20, 4,87 e 7,27%.

Santos *et al.* (2012) verificaram perda da massa específica dos grãos acondicionados em bolsas herméticas, durante a armazenagem (150 dias) em todos os tratamentos (2 teores iniciais de água x 3 temperaturas de armazenagem). Alves (2004) verificou que a perda de massa nos grãos de milho armazenados é maior na faixa de temperatura 25-30 °C, justamente porque ocorre aceleração da respiração dos grãos, sendo que estas perdas são ainda maiores na presença de insetos-pragas.

Em ambos os híbridos de milho (Tabela 24), os grãos acondicionados em bolsas herméticas apresentaram as menores perdas de massa específica durante a armazenagem, 2,05 e 2,2%, respectivamente para os híbridos 2B688RR e 30K73Hx. Esses grãos ainda apresentaram os maiores valores em relação aos grãos dos demais acondicionamentos, ao fim do período de armazenagem, no híbrido de milho 2B688RR e conjuntamente com os grãos das espigas do híbrido 30K73Hx.

Antonello *et al.* (2009) também verificaram que a perda de peso das sementes de milho armazenadas em embalagens de plástico (PET) foi reduzida e menor que a obtida nas sementes acondicionadas em sacos de algodão. Guenha *et al.* (2014) verificaram correlação significativa entre a perda de peso do arroz ao longo do tempo com os diferentes tipos de armazenagem, sendo que o armazenamento hermético foi o que apresentou os menores índices de perdas.

5.2.2.7 Peso de mil grãos

Não houve alteração significativa do peso de mil grãos, durante o tempo de armazenagem, nos acondicionamentos em sacarias convencionais e bolsas herméticas do híbrido de milho 2B688RR (Tabela 25). Nos grãos do silo constatou-se decréscimo somente aos 12 meses de armazenagem, enquanto nas espigas apenas houve variabilidade significativa aos 9 meses. Também, não se verificou diferença no peso de mil grãos entre os tipos de acondicionamentos analisados durante os 6 primeiros meses de armazenagem, já aos 12 meses somente os grãos do silo apresentaram o menor peso, com redução de 3,34% em relação ao peso inicial.

Paragisnki (2013) também não verificou diferença do peso de mil grãos durante a armazenagem nas seguintes condições de teor de água e temperatura: 12% e 25 °C, 14% e 15°C, 14% e 25 °C. Enquanto para a armazenagem com 14% de teor de água e 35 °C de temperatura houve redução de 6,79% no peso final dos grãos, após 12 meses de armazenagem. Para esse autor, a redução é provocada pela temperatura elevada que causa aumento da atividade respiratória dos grãos, provocando maior consumo dos constituintes energéticos.

Para o milho do híbrido 30k73Hx (Tabela 25), o padrão de comportamento do peso de mil grãos, durante a armazenagem, foi semelhante ao do híbrido de milho 2B688RR. Não havendo também alteração significativa do peso de mil grãos, durante o tempo de armazenagem, nos acondicionamentos em sacarias convencionais e bolsas herméticas. Enquanto no milho armazenado em espigas, houve somente diferença no tempo zero (287,98 g) e no acondicionamento em silo aos 12 meses (281,22 g), em que estes tiveram os menores pesos durante o período de armazenagem. As espigas mantiveram-se durante toda a armazenagem como um dos acondicionamentos de armazenagem com os maiores pesos volumétricos, enquanto os grãos dos demais acondicionamentos (sacarias, hermética e silo) somente diferenciaram-se aos 3 e aos 12 meses, respectivamente, quando os grãos acondicionados nas bolsas herméticas e no silo apresentaram o maior e o menor peso.

Tabela 25 Peso de mil grãos⁽²⁴⁾ de milho (g) submetidos a diferentes acondicionamentos de armazenagem durante 12 meses

Tempo (meses)	Formas de Armazenagem			
	Sacaria	Hermética 2B688RR	Silo	Espiga
0	277,92±2,7 ^{Aa}	277,92±2,7 ^{Aa}	277,92±2,7 ^{ABa}	279,03±3,2 ^{ABa}
3	283,39±4,94 ^{Aa}	283,89±0,32 ^{Aa}	286,40±2,49 ^{Aa}	283,92±8,59 ^{Aa}
6	281,80±3,29 ^{Aa}	281,11±2,24 ^{Aa}	281,31±3,08 ^{Aa}	286,96±1,58 ^{Aa}
9	282,05±2,27 ^{Ab}	288,27±0,57 ^{Aa}	276,82±11,41 ^{ABb}	272,58±5,38 ^{Bb}
12	288,55±7,53 ^{Aa}	287,72±3,05 ^{Aa}	268,63±2,93 ^{Bb}	281,57±11,52 ^{ABa}
CV(%) = 1,78				
30k73Hx				
0	286,88±1,17 ^{Aa}	286,88±1,17 ^{Aa}	286,88±1,17 ^{Aa}	287,99±1,29 ^{Ba}
3	286,63±1,95 ^{Ac}	291,77±2,62 ^{Aab}	289,58±1,71 ^{Abc}	295,84±3,55 ^{Aa}
6	286,46±4,65 ^{Ab}	289,85±0,80 ^{Ab}	288,40±1,42 ^{Ab}	296,21±2,20 ^{Aa}
9	286,95±0,70 ^{Ab}	289,22±1,96 ^{Aab}	289,08±1,73 ^{Ab}	293,21±1,98 ^{Aa}
12	289,08±3,5 ^{Ab}	288,45±0,77 ^{Ab}	281,22±2,36 ^{Bc}	294,33±3,21 ^{Aa}
CV(%) = 0,76				

Notas: ⁽²⁴⁾Médias seguidas de letras distintas, minúscula na linha e maiúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ± seguido pelo desvio padrão da média. CV(%): coeficiente de variação.

Schuh *et al.* (2011) encontraram variabilidade significativa do peso de mil grãos, somente aos 6 meses de armazenagem, a variabilidade encontrada do início aos 6 meses de armazenagem foi de 260,5 a 236,64 g e 270,14 a 250,70 g, respectivamente para os tratamentos de secagem ar/GLP e ar/natural.

Catão *et al.* (2010) encontraram grande variabilidade na massa de mil grãos (101,43 a 340,71 g) de 17 variedades crioulas de milho armazenadas em embalagens plásticas (garrafas PET). Após 6 meses de armazenagem, constataram redução média de massa dos grãos em 10 variedades, aumento em 3 e manutenção em 4. Tal variabilidade é atribuída por esses autores às diferenças de material genético entre as variedades de milho.

5.2.3 Microbiota: perfil geral

A presença de *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. foi detectada desde a colheita em ambos os híbridos de milho (Tabela 26). Sendo que nesta etapa, a contagem de *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp. foi maior no híbrido 2B688RR, enquanto a contagem de *Penicillium* sp. e a contagem total de bolores e leveduras foi maior no híbrido 30K73Hx. Também Souza (2011) encontrou variabilidade na contagem média de fungos, em diferentes cultivares de milho (Asteca, Caiano, IPR e DKB) recém-colhido.

Apesar dos gêneros fúngicos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. serem classificados como fungos de armazenamento, dada a sua maior ocorrência nos grãos de milho nas etapas pós-colheita e *Fusarium* sp. como fungo de campo por ser um patógeno da planta ainda durante o cultivo (SCUSSEL, 2002), muitos pesquisadores também diagnosticaram a sua presença, em milho recém colhido (DILKIN *et al.*, 2000; SANTIN *et al.*, 2001; MARQUES *et al.*, 2009; SANTIN *et al.*, 2009; ROCHA, 2010)

Dilkin *et al.* (2000) encontraram *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. em amostras de milho recém-colhido em Santa Maria-RS, respectivamente em 23,6, 57,1 e 14,3% das amostras. Rocha (2010) constatou a presença desses fungos em 200 amostras de milho recém-colhido, analisadas em quatro regiões do Brasil, cuja predominância foi da espécie *Fusarium verticillioides* e a presença de *Aspergillus* sp. somente foi constatada nas regiões Sul, Centro-Oeste e Nordeste, respectivamente em 9,8, 14 e 12,6% das amostras.

Santin *et al.* (2001) e Marques *et al.* (2009), relacionando a incidência fúngica com a umidade de colheita do milho, constataram que a incidência de *Fusarium* sp. é maior em grãos colhidos com elevada umidade, enquanto a incidência de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. é pequena, ao passo que, em grãos colhidos com baixo teor de água a recíproca também foi verificada.

Após o processo de secagem natural ao sol, onde se reduziu o teor de água dos grãos a níveis inferiores a 13% b.u., ainda se constatou a presença dos gêneros *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., em todas as amostras analisadas (Tabela 26), com distribuição similar a encontrada após a colheita. Leños *et al.* (2007) verificaram a presença de *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. no início da armazenagem, respectivamente em 0,6, 59,7 e 28,6% das amostras. Resultados correlatos foram obtidos por Santin *et al.* (2009).

Tabela 26 Incidência (%) e contagem (UFC g⁻¹) de bolores nos grãos de milho dos híbridos 2B688RR e 30K73Hx após a colheita, após a secagem (início da armazenagem) e durante os 12 meses de armazenagem

Fungos	Híbrido 2B688RR			Híbrido 30K73Hx		
	Contagem (UFC g ⁻¹)		Incidência (%)	Contagem (UFC g ⁻¹)		Incidência (%)
	Mínimo	Máximo		Mínimo	Máximo	
Após a colheita						
<i>Aspergillus</i> sp.	1 x 10 ⁴	5,7 x 10 ⁴	100	1 x 10 ²	0,5 x 10 ³	100
<i>Fusarium</i> sp.	2 x 10 ³	5,3 x 10 ⁵	100	1,1 x 10 ⁴	8,1 x 10 ⁴	100
<i>Penicillium</i> sp.	1 x 10 ⁴	5,5 x 10 ⁴	100	1 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁵	100
Total ⁽²⁵⁾	1,6 x 10 ⁶	3,6 x 10 ⁶	100	1,8 x 10 ⁵	3,9 x 10 ⁶	100
Após secagem (Início da Armazenagem)						
<i>Aspergillus</i> sp.	0,5 x 10 ³	1 x 10 ³	100	0,5 x 10 ³	1 x 10 ³	100
<i>Fusarium</i> sp.	1 x 10 ³	1,9 x 10 ⁵	100	2,8 x 10 ⁴	3,2 x 10 ⁵	100
<i>Penicillium</i> sp.	2 x 10 ⁴	4,8 x 10 ⁴	100	3,8 x 10 ⁴	5,2 x 10 ⁴	100
Total ⁽²⁵⁾	9 x 10 ⁴	4,4 x 10 ⁵	100	5,7 x 10 ⁴	7,2 x 10 ⁵	100
<i>Aspergillus</i> sp.	-	2,7 x 10 ⁵	81,4	-	2,5 x 10 ⁴	85,19
<i>Fusarium</i> sp.	-	4,9 x 10 ⁵	90,74	-	5,5 x 10 ⁵	92,5
<i>Penicillium</i> sp.	-	3,8 x 10 ⁵	88,44	-	2,2 x 10 ⁵	91,7
Total ⁽²⁵⁾	2,5 x 10 ³	9 x 10 ⁵	100	3,4 x 10 ³	8,1 x 10 ⁵	100

Notas: ⁽²⁵⁾Contagem total de bolores e leveduras; ⁽²⁾ nd = não detectado.

A presença desses três gêneros também foi verificada nas amostras de grãos analisadas durante os 12 meses de armazenagem, em ambos os híbridos de milho (Tabela 26). A contagem total máxima de bolores e leveduras foi maior no híbrido 2B688RR (9 x 10⁵ UFC g⁻¹). Contudo, a contagem máxima dos gêneros fúngicos variou entre os híbridos de milho. Tanto a contagem de *Fusarium* sp quanto a incidência foram maiores no híbrido 30K73Hx, enquanto a contagem de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. foi maior no híbrido 2B688RR, ao contrário da incidência que foi maior no híbrido 30K73Hx. Além disso,

verifica-se que o valor da contagem nos diferentes híbridos, apresenta o mesmo grau de potência entre os tipos fúngicos, exceto para o *Aspergillus* sp. ($\times 10^4$ no híbrido 30K73Hx e $\times 10^5$ no híbrido 2B688RR), esse fato aliado às pequenas diferenças percentuais de incidência, fornecem indícios de similaridade na microbiota dos híbridos de milho analisados.

Também se verifica na Tabela 26, a prevalência do gênero *Fusarium* durante os 12 meses de armazenagem, tanto em termos de frequência quanto maior contagem, para ambos os híbridos de milho. Esse resultado já era esperado, pois outras pesquisas realizadas no Brasil (ALMEIDA; CORREA; MALLOZZI, 2000; ONO *et al.*, 2006; SILVA, 2007b; ROCHA, 2010; BENTO, 2011; ATAYDE, 2013) também descreveram resultados correlatos. A predominância observada deve-se ao fato de esse fungo ser endofítico (patógeno da cultura do milho).

Coradi (2010) verificou que os níveis de contaminação por fungos e por bactérias diminuem durante as etapas de produção da ração, principalmente após a peletização com uso de temperaturas acima de 80 °C. Mas, apesar disso, a contaminação resultante ainda pode comprometer a segurança alimentar das rações. A variação de contagem encontrada por ele entre a matéria-prima (milho em grão) e a ração elaborada foi, respectivamente $6,8 \times 10^3$ para $1,1 \times 10^3$ UFC g⁻¹ para *Fusarium* sp., $6,7 \times 10^3$ para $1,5 \times 10^3$ UFC g⁻¹ para *Penicillium* sp. e $5,8 \times 10^3$ para $0,5 \times 10^3$ UFC g⁻¹ *Aspergillus* sp.

Constatou-se neste experimento de armazenagem, para ambos os híbridos de milho, que a contagem dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* e, ainda, o total de bolores e leveduras foram significativamente influenciados ($p < 0,05$), pela interação dos fatores tipos de acondicionamento e tempos de armazenagem, cujos resultados estão representados nas Figuras 15-18 a seguir.

5.2.3.1 *Aspergillus* sp. nos diferentes acondicionamentos de armazenagem

A presença de *Aspergillus* sp. foi detectada em 82 das 108 amostras de milho analisadas durante este experimento de armazenagem, respectivamente em 40 amostras do híbrido de milho 2B688RR e 42 amostras do híbrido de milho 30k73Hx. No primeiro, em todas as amostras dos acondicionamentos em sacarias convencionais, bolsas herméticas e silo, enquanto nas amostras das espigas somente em 33,33%. No segundo híbrido, esse gênero fúngico também foi detectado em 100% das amostras acondicionadas em bolsas herméticas e silo, em 93,33% das amostras das sacarias convencionais e em 53,33% das espigas.

A contagem média de *Aspergillus* sp. nos grãos, após o processo de secagem (tempo 0 de armazenagem), 1×10^3 UFC g⁻¹ em ambos os híbridos de milho, está abaixo da faixa obtida por Silva (2007b): 6×10^3 a 6×10^4 UFC g⁻¹, cuja pesquisa foi realizada com grãos de milho coletados em cooperativas da região norte do Paraná na safra 2003.

Verifica-se que a contagem de *Aspergillus* sp., nos grãos do híbrido de milho 2B688RR, não teve variação significativa durante o tempo na armazenagem nas espigas (Figura 15 (a)) e apresentou progressivo aumento nos grãos acondicionados no silo, que ao fim da armazenagem estavam com a maior contagem dentre todos os acondicionamentos. Também se verificou aumento da contagem de *Aspergillus* sp., durante o período de armazenagem nos grãos acondicionados em sacarias convencionais e bolsas herméticas, com respectivos picos aos 3 e 6 meses, seguidos de estabilidade. Dos 3 aos 9 meses de armazenagem, o milho armazenado em espigas diferiu dos demais acondicionamentos apresentando a menor contagem de *Aspergillus* sp. e, aos 12 meses, apresentaram, juntamente com as sacarias, as menores contagens.

No híbrido de milho 30K73Hx não se verificou variação significativa na contagem de *Aspergillus* sp., durante o tempo de armazenagem, nos grãos dos acondicionamentos em sacarias, bolsas herméticas e espigas (Figura 15 (b)). Nos grãos do silo houve estabilidade da contagem de *Aspergillus* sp. até os 9 meses, seguido de redução aos 12 meses. Também para esse híbrido de milho, a partir dos 3 meses de armazenagem, as espigas apresentam-se dentre os acondicionamentos com menor contagem de *Aspergillus* sp. nos grãos, enquanto, ao fim da armazenagem, o acondicionamento em bolsas herméticas continham os grãos com a maior contagem.

A elevação da contagem de *Aspergillus* sp nos grãos, do início aos 6 meses de armazenagem, nos acondicionamentos em sacarias e silo de ambos os híbridos de milho (Figura 15 (a) e (b)), pode estar relacionada às altas taxa de UR desse período (médias mensais variando de 73,4 a 88,4%). Os resultados obtidos por Dias (2012) corroboram essa hipótese, pois ele constatou grande aumento na incidência natural de *Aspergillus flavus* durante o armazenamento, em umidades atmosféricas de armazenamento de 70%, mesmo com a presença da espécie competidora *Fusarium verticillioides* em 100% das amostras.

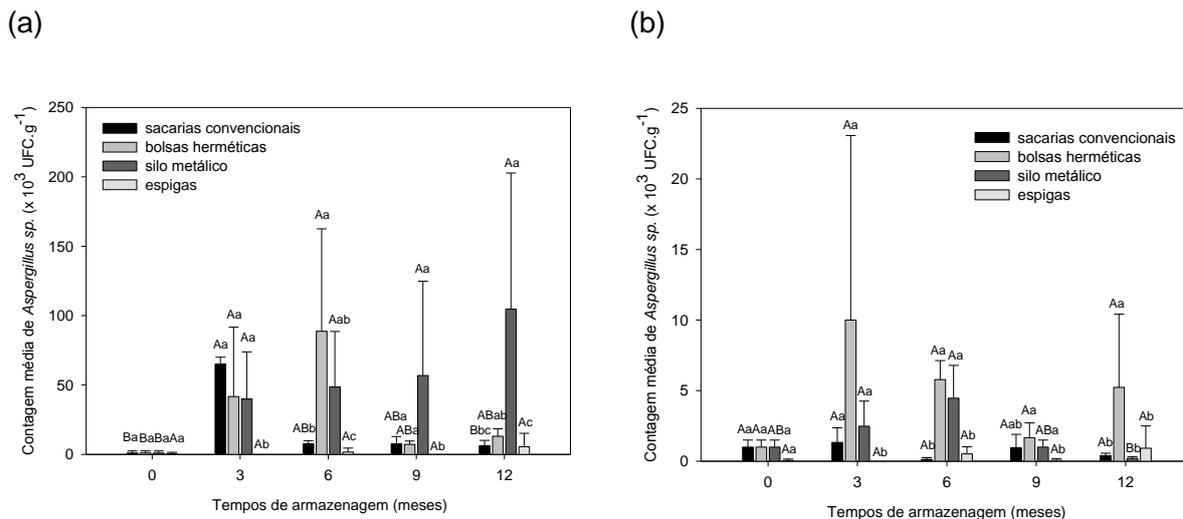


Figura 15 Contagem média de colônias *Aspergillus* sp. (x 10³ UFC g⁻¹) no milho durante o armazenamento de verão, em diferentes acondicionamentos e tempos de armazenagem para os híbridos de milho: (a) 2B688RR (b) 30K73Hx.

Nota: Letras distintas, minúscula entre formas de armazenagem dentro cada tempo e maiúsculas entre tempos dentro as formas de armazenagem, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.2.3.2 *Fusarium* sp. nos diferentes acondicionamentos de armazenagem

Detectou-se *Fusarium* sp. em 99 das 108 amostras de milho analisadas, sendo 92,59% em amostras do híbrido de milho 2B688RR, e em 90,74% do híbrido de milho 30K73Hx. No primeiro, verificou-se a presença desse fungo em todas as amostras das sacarias convencionais e bolsas herméticas, em 86,67% das amostras das espigas e 80% do silo. No segundo híbrido, a presença do fungo foi verificada em 80% das amostras das sacarias convencionais, 93,33% das espigas e em 100% das bolsas herméticas e do silo.

Os resultados da contagem média de *Fusarium* sp. nos grãos de milho após a secagem, início da armazenagem, tanto do híbrido 2B688RR quanto do híbrido 30k73Hx (respectivamente 19 x 10⁴ e 31,75 x 10⁴ UFC g⁻¹) são semelhantes aos níveis (12 x 10³ a 7 x 10⁶ UFC g⁻¹) obtidos por Silva (2007b) em sua pesquisa.

Observa-se que a contagem de *Fusarium* sp. no híbrido de milho 2B688RR (Figura 16 (a)), armazenado em espigas, aumentou dos 3 aos 9 meses de armazenagem e, em seguida, reduziu. Enquanto nos acondicionamentos em sacarias e silo ocorreu aumento somente até os 3 meses, seguido de uma progressiva redução durante a armazenagem. Nas bolsas herméticas houve oscilação da contagem de *Fusarium* sp. nos grãos, com redução nos primeiros três meses, aumento dos 3 aos 6 meses e novamente redução. Os picos de contagem nos grãos foram aos 3 meses para os acondicionamentos em sacarias

convencionais e silo, aos 6 meses para as bolsas herméticas e aos 9 meses para as espigas. Coincidentemente, a incidência de *Aspergillus* sp. nesse mesmo híbrido de milho teve seus picos de contagem na mesma época nas armazenagens em sacarias e bolsas herméticas.

A contagem de *Fusarium* sp. nos grãos do híbrido de milho 30k73Hx (Figura 16 (b)), apresenta um padrão de comportamento semelhante ao dos grãos do híbrido de milho 2B688RR nos acondicionamentos em espigas e bolsas herméticas, exceto nos grãos das espigas aos 9 meses de armazenagem. Mas em contraponto, houve somente redução da contagem de *Fusarium* sp., durante o tempo de armazenagem, nos acondicionamentos em sacarias convencionais e silo.

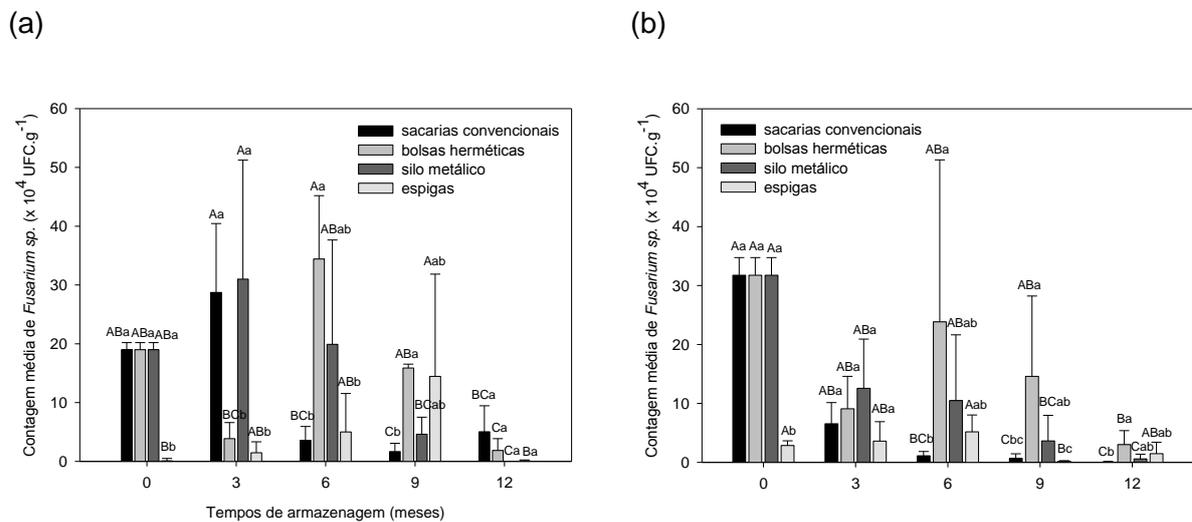


Figura 16 Contagem média de colônias *Fusarium* sp. (x 10⁴ UFC g⁻¹) no milho durante o armazenamento de verão, em diferentes acondicionamentos e tempos de armazenagem para os híbridos de milho: (a) 2B688RR (b) 30K73Hx.

Nota: Letras distintas, minúscula entre formas de armazenagem dentro cada tempo e maiúsculas entre tempos dentro as formas de armazenagem, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.2.3.3 *Penicillium* sp. nos diferentes acondicionamentos de armazenagem

A incidência de *Penicillium* sp. ocorreu em 98 das 108 amostras analisadas, em 91,7% das amostras do híbrido de milho 30k73Hx e 88,44% das amostras do híbrido de milho 2B688RR. Os resultados da contagem média de colônias: 3,5 x 10⁴ e 5,46 x 10⁴ UFC g⁻¹, respectivamente para grãos e espigas do híbrido 2B688RR e 5,25 x 10⁴ e 2,69 x 10⁴ UFC g⁻¹ para grãos e espigas do híbrido 30k73Hx, também estão de acordo com o obtido por Silva (2007b) 10 x 10³ a 2 x 10⁶ UFC g⁻¹.

A contagem de *Penicillium* sp. nos grãos do híbrido de milho 2B688RR (Figura 17 (a)) não apresentou variação significativa, durante a armazenagem, nos acondicionamentos em sacarias convencionais, silo e espigas. Nos grãos acondicionados em bolsas herméticas a contagem somente apresentou variação aos 6 meses de armazenagem, cuja contagem foi a máxima ($17,58 \times 10^4$ UFC g^{-1}). Dentre os tipos de acondicionamento, as espigas apresentaram aumento nas contagens de *Penicillium* sp. a partir dos 3 meses de armazenagem.

No híbrido de milho 30k73Hx (Figura 17 (b)) verifica-se que a contagem de *Penicillium* sp. nos grãos apresenta comportamento semelhante entre os acondicionamentos em sacarias convencionais e silo e entre espigas e bolsas herméticas durante todo período de armazenagem. Nos dois primeiros acondicionamentos, a contagem diminui progressivamente durante o tempo de armazenagem. Enquanto nos dois últimos acondicionamentos verifica-se crescimento até os 6 meses, quando a contagem é máxima, seguida de uma acentuada redução até o fim da armazenagem.

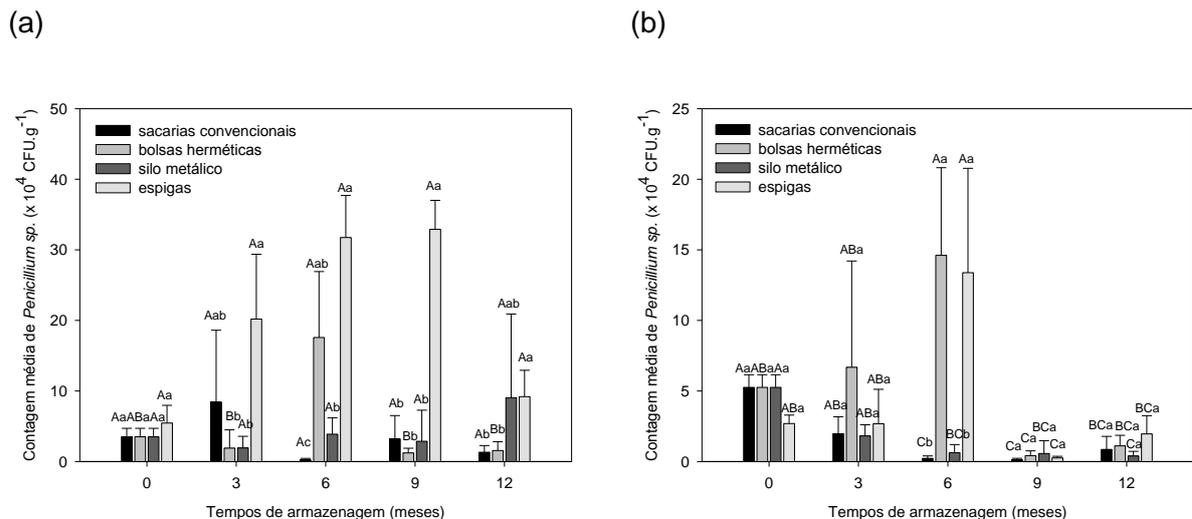


Figura 17 Contagem média de colônias *Penicillium* sp. ($\times 10^4$ UFC g^{-1}) no milho durante o armazenamento de verão, em diferentes acondicionamentos e tempos de armazenagem para os híbridos de milho: (a) 2B688RR (b) 30K73Hx.

Nota: Letras distintas, minúscula entre formas de armazenagem dentre cada tempo e maiúsculas entre tempos dentre as formas de armazenagem, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.2.3.4 Contagem total de bolores e leveduras nos diferentes acondicionamentos de armazenagem

A contagem média de bolores e leveduras no milho, após o processo de secagem (tempo 0 de armazenagem), tanto no híbrido de milho 2B688RR quanto no híbrido de milho 30k73Hx (respectivamente $46,86 \times 10^4$ e $69,85 \times 10^4$ UFC g⁻¹ nos grãos e $7,45 \times 10^4$ e $6,61 \times 10^4$ UFC g⁻¹ nas espigas), estão de acordo a faixa obtida por Silva (2007b) em sua pesquisa: 17×10^3 a 23×10^6 UFC g⁻¹ e por Souza (2011), cuja média de contagem ficou na faixa de 10^4 UFC g⁻¹.

Verifica-se que a contagem de bolores e leveduras do híbrido de milho 2B688RR (Figura 18 (a)) foi significativamente menor no milho armazenado em espigas no início da armazenagem (tempo 0) e que o padrão de variação diferiu entre os acondicionamentos, durante o tempo de armazenagem. No milho armazenado em espigas houve aumento da contagem total até os 9 meses, seguido de significativa redução. Nas sacarias convencionais e silo verifica-se redução da contagem total de bolores e leveduras nos grãos ao longo do tempo, no primeiro acondicionamento desde os 6 meses e no segundo somente aos 12 meses. Nas bolsas herméticas ocorreu aumento da contagem total de bolores e leveduras nos grãos até os 6 meses de armazenagem, seguido de redução dos 9 aos 12 meses.

A contagem de bolores e leveduras do híbrido de milho 30K73Hx (Figura 18 (b)) também foi significativamente menor no milho armazenado em espigas, no início da armazenagem, com redução aos 9 meses, seguido de aumento. Enquanto nos demais acondicionamentos de armazenagem verifica-se somente redução com o tempo, nas sacarias convencionais e no silo a partir dos 9 meses e nas bolsas herméticas a partir dos 12 meses. Sendo que, partir dos 6 meses de armazenagem, os grãos de milho acondicionados nas sacarias convencionais estiveram sempre no *ranking* das menores contagens de bolores e leveduras.

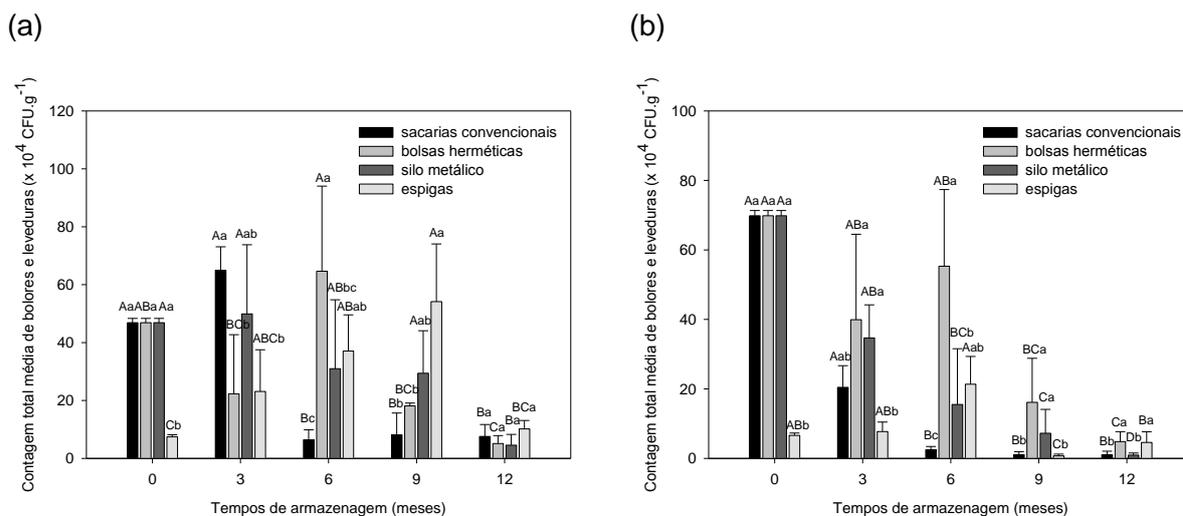


Figura 18 Contagem média de bolores e leveduras ($\times 10^4$ UFC g⁻¹) no milho durante o armazenamento de verão, em diferentes acondicionamentos e tempos de armazenagem para os híbridos de milho: (a) 2B688RR (b) 30K73Hx.

Nota: Letras distintas, minúscula entre formas de armazenagem dentro cada tempo e maiúsculas entre tempos dentro as formas de armazenagem, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para Cançado (2004), a elevada contagem de bolores e leveduras pode estar relacionada a um conjunto de fatores tanto da pré quanto do pós-colheita como: precariedade nas condições higiênicas de equipamentos, infestações por insetos e pragas na cultura, regulagem imprópria na colheitadeira (possibilitando maiores danos aos grãos), secagem ineficiente e armazenagem inadequada. Em sua pesquisa diagnosticou variabilidade de $1,2 \times 10^2$ a $3,6 \times 10^3$ UFC g⁻¹, na contagem total de bolores e leveduras em milho armazenado por 40 dias.

5.2.4 Ocorrência de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂)

Como neste experimento de armazenagem, a presença de *Aspergillus* sp. foi detectada desde a colheita (nas amostras em grão e em espigas), em 82 amostras de milho das 108 analisadas durante o experimento, do início aos 12 meses de armazenagem, efetuou-se a pesquisa de aflatoxinas em 84 amostras, 41 amostras do híbrido de milho 2B688RR e 43 amostras do híbrido de milho 30K73Hx.

Apesar da presença do fungo *Aspergillus* sp. nos grãos ter sido verificada ainda na colheita, a presença da toxina não foi detectada somente após o processo de secagem e apenas nas amostras em grãos, cuja soma (B₁+B₂+G₁+G₂) foi respectivamente 123,2 µg kg⁻¹ e 3,24 µg kg⁻¹ para os híbridos de milho 2B688RR e 30K73Hx. Para Almeida, Correa e Mallozzi (2000), a presença de *Aspergillus* sp. nos grãos, ainda na colheita, indica a

possibilidade de danos aos grãos armazenados, caso o patógeno encontre condições que favoreçam o seu desenvolvimento.

Marques *et al.* (2009) verificaram a contaminação de grãos de milho por aflatoxinas ainda no campo, segundo eles as condições climáticas no momento da colheita podem favorecer a produção de aflatoxinas, assim como, a densidade de plantas, pode possibilitar um microclima propício ao desenvolvimento do gênero *Aspergillus* e produção da toxina.

Das 40 amostras do híbrido de milho 2B688RR que continham *Aspergillus* sp., durante a armazenagem, detectaram-se aflatoxinas em 92,5% (37 amostras), em níveis de 20,89 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 197,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a soma $B_1+B_2+G_1+G_2$ (Figura 19). Coradi (2010) também encontrou contaminação por aflatoxinas em milho seco e limpo, matéria-prima para formulação de rações, em níveis de 18 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 160,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Embora o fungo tenha aparecido nas espigas, na amostra inicial e, em outras duas amostras, ao longo do tempo de armazenagem (6 e 12 meses), a presença de aflatoxinas não foi detectada em nenhuma destas, enquanto nos demais acondicionamentos detectaram-se em 100% das amostras, a partir dos 3 meses de armazenagem e na amostra em grãos inicial a armazenagem (123,20 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Das 37 amostras do híbrido 2B688RR, nas quais foram detectadas aflatoxinas, 91,89% (34 amostras) continham a toxina B_2 em níveis de 9,47 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 169,24 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 86,49% (32 amostras) continham a G_2 em níveis de 2,78 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 96,05 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 72,97% (27 amostras) continham a B_1 em níveis de 0,61 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 76,51 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 56,76% (21 amostras) amostras continham a G_1 em níveis de 2,05 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 17,67 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Enquanto que, das 42 amostras do híbrido 30K73Hx que continham *Aspergillus* sp., durante os tempos de armazenagem, a toxina foi detectada em 78,6% delas (33 amostras), em níveis de 3,03 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 51,58 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para a soma $B_1+B_2+G_1+G_2$ (Figura 20). Também nesse híbrido não se detectaram aflatoxinas nas amostras de milho em espigas. Enquanto nos demais acondicionamentos, a partir dos 3 meses de armazenagem, as aflatoxinas foram detectadas em 100% das amostras do silo, em 91,67% das amostras das bolsas herméticas, 75% das sacarias convencionais e, ainda, na amostra inicial da armazenagem (3,24 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Das 33 amostras, nas quais foram detectadas aflatoxinas no híbrido de milho 30K73Hx, 66,67% (22 amostras) continham a toxina G_2 em níveis de 3,03 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 22,36 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 51,52% (17 amostras) continham a B_2 em níveis de 8,99 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 29,32 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 6,06% (2 amostras) continham a B_1 em níveis de 2,86 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 16,14 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 6,06% (2 amostras) amostras continham a G_1 em níveis de 4,14 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 11,58 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Bento *et al.* (2012) detectaram contaminação por aflatoxinas em 21,4% das 84 amostras de milho armazenadas em diferentes regiões do Mato Grosso. O tipo mais

incidente foi a B₁ (com níveis 2,4 µg kg⁻¹ a 84,1 µg kg⁻¹), seguido da B₂ (1 µg kg⁻¹ a 4,6 µg kg⁻¹), G₁ (1 µg kg⁻¹ a 22,6 µg kg⁻¹) e G₂ (1 µg kg⁻¹ a 1,8 µg kg⁻¹). Rocha (2009) encontrou aflatoxinas dos tipos B₁ e B₂, respectivamente em 14 e 10% das amostras do Rio Grande do Sul, em níveis de 13,7 µg kg⁻¹ a 1393 µg kg⁻¹ para B₁ e 5,6 µg kg⁻¹ a 55,7 µg kg⁻¹ para B₂.

Todas as amostras do híbrido de milho 2B688RR, em que a presença de aflatoxinas foi detectada (Figura 19) apresentaram soma B₁+B₂+G₁+G₂ acima do LMT preconizado pela ANVISA (20 µg kg⁻¹) para milho em grão, com contaminação média de 76,09 µg kg⁻¹, sendo que a detecção mínima foi 20,89 µg kg⁻¹ e máxima 197,51 µg kg⁻¹. Enquanto no híbrido de milho 30K73Hx (Figura 20) apenas 12,12% (4) das amostras contaminadas com aflatoxinas apresentaram soma B₁+B₂+G₁+G₂ acima do LMT, com média 11,9 µg kg⁻¹, detecção mínima de 3,03 µg kg⁻¹ e máxima de 51,58 µg kg⁻¹. Rocha (2010), analisando 200 amostras de milho recém-colhido, detectou aflatoxinas em 21, destas 16 excederam o LMT de 20 µg kg⁻¹ para a soma B₁+B₂+G₁+G₂, cujo maior nível encontrado foi 1393 µg kg⁻¹.

Ainda que a aflatoxina do tipo B₁ tenha sido a terceira mais incidente para ambos os híbridos de milho, ficando atrás dos tipos B₂ e G₂, que, segundo Dilkin *et al.* (2000), possuem, respectivamente, 20 e 10% da sua toxicidade, os níveis de contaminação encontrados foram altos para todos os tipos, principalmente no híbrido de milho 2B688RR, no qual a detecção da B₁ ocorreu em 72,97% (27) das amostras com média 29,26 µg kg⁻¹ (variando de 0,61 µg kg⁻¹ a 76,51 µg kg⁻¹). Os níveis de contaminação encontrados são preocupantes, e comprometem a segurança alimentar desse milho, com riscos para a saúde humana e animal.

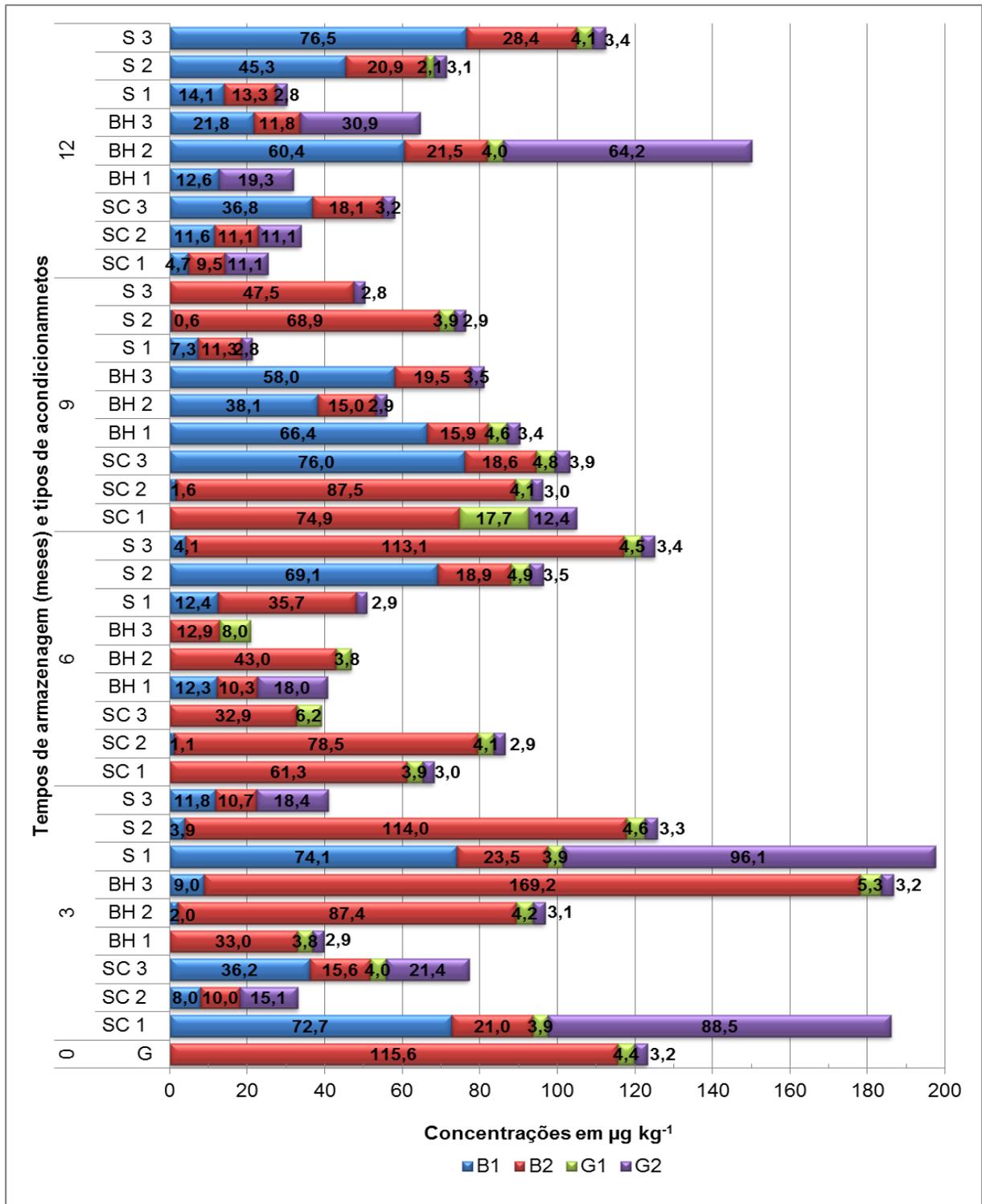


Figura 19 Ocorrência de aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) em $\mu\text{g kg}^{-1}$, nas amostras de milho do híbrido 2B688RR durante o armazenamento de verão, nos diferentes acondicionamentos e tempos de armazenagem (SC: sacarias convencionais; BH: bolsas seladas hermeticamente; S: silos metálicos; G: amostras em grão do início da armazenagem), os números (1,2 ou 3) compreendem a repetição do tratamento no respectivo tempo.

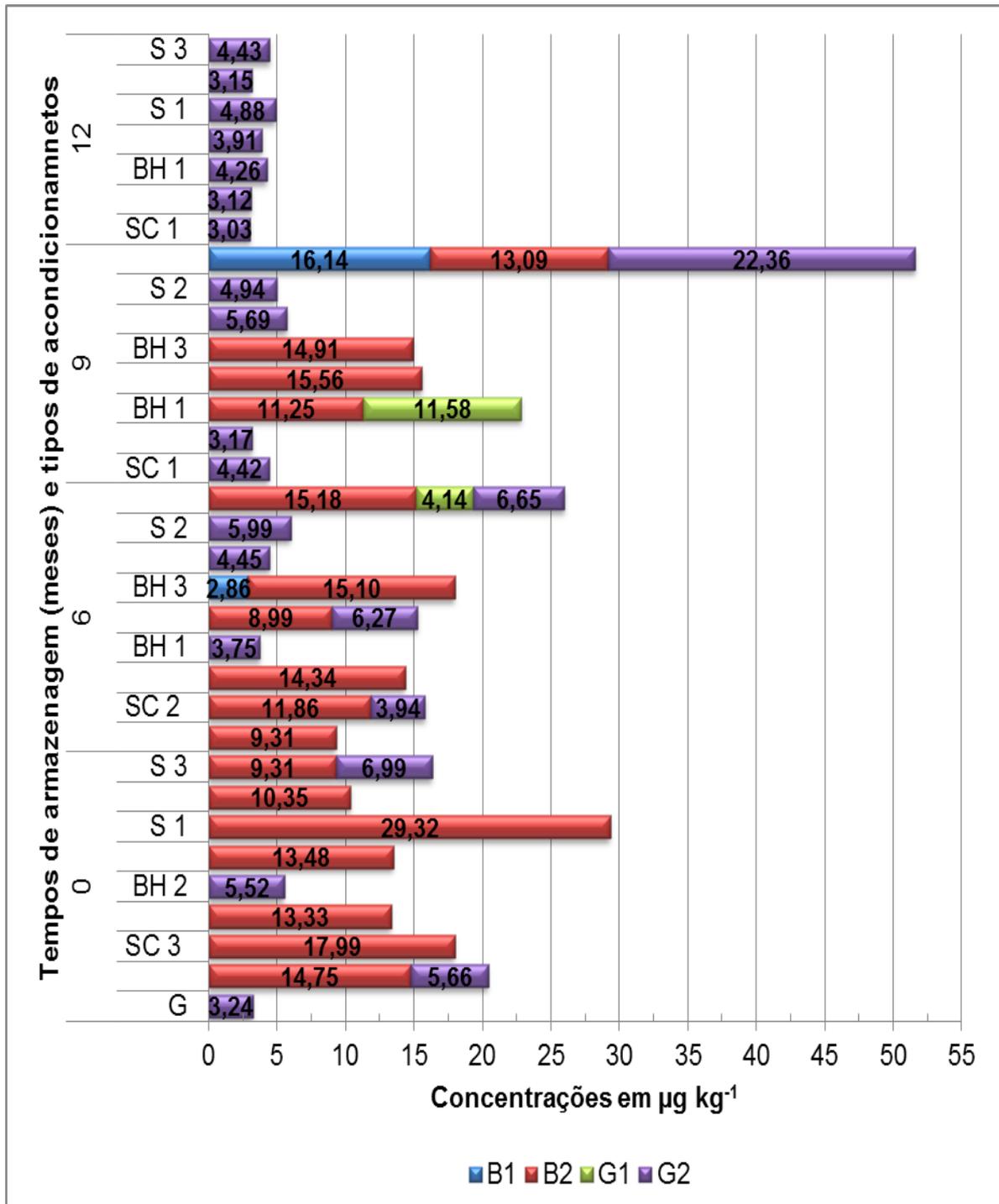


Figura 20 Ocorrência de aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) em $\mu\text{g kg}^{-1}$, nas amostras de milho do híbrido 30K73Hx, durante o armazenamento de verão, nos diferentes acondicionamentos e tempos de armazenamento (SC: sacarias convencionais; BH: bolsas seladas hermeticamente; S: silos metálicos; G: amostras em grão do início da armazenagem), os números (1,2 ou 3) compreendem a repetição do tratamento no respectivo tempo.

Machinski *et al.* (2001) encontraram aflatoxinas em 60 das 110 amostras de milho, recém-colhido de três regiões do estado de São Paulo, de 48 cultivares comerciais. Os níveis de aflatoxina do tipo B₁ variaram entre 6 e 1600 µg kg⁻¹, sendo que B₁ e B₂ foram os tipos mais incidentes, seguidos da G₁ e G₂.

Observando-se as Figuras 19 e 20 verifica-se que os níveis de contaminação são mais elevados no híbrido 2B688RR. Para Machinski *et al.* (2001), muitos fatores podem contribuir para uma maior ou menor produção de aflatoxinas em milho, como o local de cultivo, a variedade, o tipo de híbrido (simples, duplo ou triplo), o tipo de endosperma do grão (dentado, semi-dentado, duro, semi-duro) e o número de dias para o florescimento (60, 65 e 70 dias). Outros pesquisadores corroboram essas observações: Tédihou *et al.* (2012) acrescem a influência do sistema de cultivo e da época de semeadura; Marques *et al.* (2009) incluem a época e a umidade de colheita e Rosseto *et al.* (2003), a eficiência da secagem.

Embora o gênero *Fusarium* tenha tido a maior ocorrência nas amostras de milho deste experimento de armazenagem, respectivamente 90,74 e 92,54% das amostras dos híbridos de milho 2B688RR e 30K73Hx (Tabela 26), a alta ocorrência de *Aspergillus* sp. e aflatoxinas contrariam alguns relatos (LILLEHOJ *et al.*, 1982; ZUMMO; SCOTT, 1992; MARIN *et al.*, 1998b; ROCHA, 2010; ATAYDE, 2013) de que a elevada incidência de *Fusarium* sp. pode coibir a ocorrência de *Aspergillus* sp. e a produção de aflatoxinas. Também Abbas *et al.* (2006) afirmam que a alta incidência de *Fusarium* sp. parece não proteger da produção de aflatoxinas.

Dias (2012) verificou significativa diferença nos níveis de contaminação por aflatoxinas, em grãos de milho submetidos à armazenagem em umidades atmosféricas 30, 70 e 80%. A máxima contaminação detectada foi 6 µg kg⁻¹ para as UR 30 e 80% e variou de 100 a 150 µg kg⁻¹ para a UR 70%.

Pelo teste de Kruskal Wallis verificou-se, em ambos os híbridos de milho, diferença significativa ($p < 0,05$) na ocorrência de aflatoxinas (B₁+B₂+G₁+G₂), somente em relação aos tipos de acondicionamentos de armazenagem, tanto a interação dos fatores (tempo e tipos de acondicionamentos) quanto o fator tempo (individualmente) não apresentaram efeitos significativos (Figuras 21 (a) e (b)). O acondicionamento em espigas diferiu dos demais acondicionamentos em ambos os híbridos de milho, pois não houve detecção de aflatoxinas no milho submetido a esse acondicionamento de armazenagem, em nenhum dos tempos analisados, enquanto a ocorrência média da soma de aflatoxinas (B₁+B₂+G₁+G₂) nos grãos dos demais acondicionamentos, durante a armazenagem, foi respectivamente 85,42 µg kg⁻¹, 84,99 µg kg⁻¹ e 91,22 µg kg⁻¹ para as sacarias convencionais, bolsas herméticas e silo do

híbrido de milho 2B688RR e nessa mesma ordem $6,75 \mu\text{g kg}^{-1}$, $9,37 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $11,78 \mu\text{g kg}^{-1}$ para os acondicionamentos do híbrido de milho 30K73Hx.

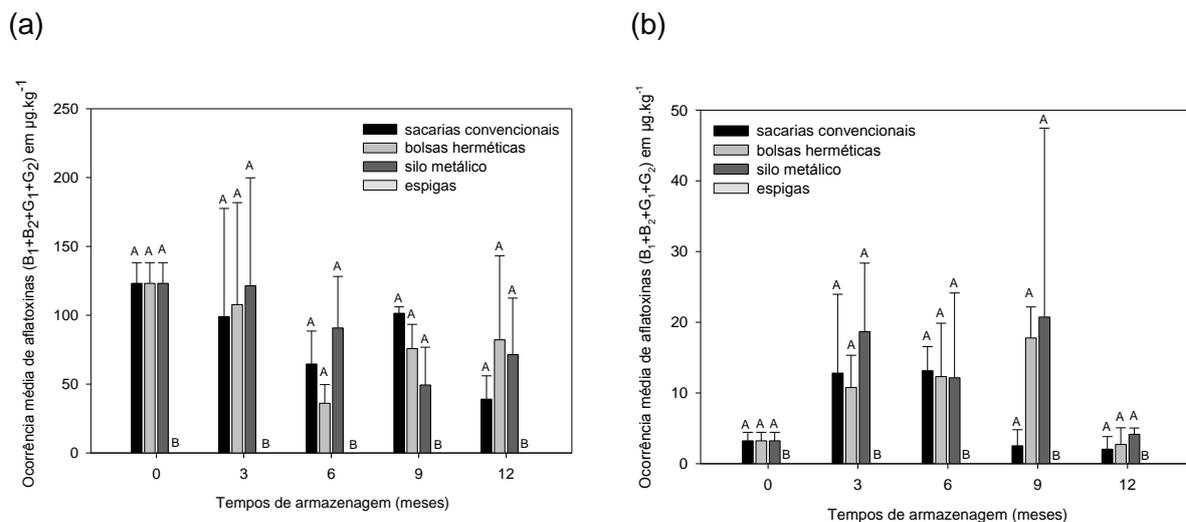


Figura 21 Ocorrência média de aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) durante no milho durante o armazenamento de verão, em diferentes acondicionamentos e tempos de armazenamento para os híbridos de milho: (a) 2B688RR (b) 30K73Hx.

Nota: Letras distintas, minúscula entre formas de armazenamento dentre cada tempo e maiúsculas entre tempos dentre as formas de armazenamento, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ferrari Filho (2011) detectou a presença de aflatoxinas em todas as amostras de milho, desde a secagem até os 9 meses de armazenamento, em todos os tratamentos de analisados por ele, contudo em sua pesquisa não fez a quantificação das mesmas. Já Saleemullah *et al.* (2006) constataram que o conteúdo de aflatoxinas em cereais foi influenciado pelo período de armazenamento, sendo que dos 12 aos 18 meses verificou-se um acréscimo de $27,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ para $31,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ no conteúdo total de aflatoxinas.

5.2.5 Considerações sobre o armazenamento do milho safra de verão

Verificou-se neste experimento de armazenamento para híbridos de milho, que os grãos acondicionados em bolsas seladas hermeticamente apresentaram o menor teor de água, durante todo o período de armazenamento. Verificou-se também que o conteúdo de cinzas dos grãos aumentou com o tempo, indicando aumento da degradação dos grãos durante a armazenagem.

O conteúdo de lipídios dos grãos de milho mostrou-se variável ao longo do tempo, enquanto o teor de proteínas manteve-se estável nos grãos de todos os acondicionamentos

do híbrido 2B688RR. No híbrido 30K73Hx, o conteúdo de lipídios dos grãos foi maior no milho armazenado em espigas, apresentando redução em todos os acondicionamentos com o tempo de armazenagem.

Tanto a percentagem de grãos sem defeito quanto o peso volumétrico dos grãos, reduziram durante o tempo de armazenagem, independente do híbrido de milho e do tipo de acondicionamento, confirmando a degradação dos grãos ao longo da armazenagem.

De modo geral, o peso de mil grãos de ambos os híbridos de milho não apresentou variabilidade nas sacarias convencionais, bolsas herméticas e espigas; somente reduziu nos silos apresentando o menor peso ao fim da armazenagem.

Neste experimento, a presença dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* foi constatada nos grãos desde a colheita, e prevaleceu durante o período de armazenagem respectivamente em 83,3, 91,6 e 90,07% das amostras analisadas. Verificou-se efeito significativo da interação tipo de acondicionamento e tempo de armazenagem na incidência desses três gêneros fúngicos, e ainda na contagem total de bolores e leveduras para ambos os híbridos de milho.

O milho acondicionado em espigas teve a menor ocorrência de *Aspergillus* sp. e a maior de *Penicillium* sp. nos dois híbridos de milho, e ainda, a menor ocorrência de *Fusarium* sp. no híbrido 30k73Hx.

Os grãos do híbrido de milho 30K73Hx acondicionados em bolsas herméticas, apresentaram a maior contagem média de *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., total bolores e leveduras dos 3 aos 9 meses de armazenagem.

Detectaram-se aflatoxinas em 83,3% das amostras de milho analisadas, não sendo constatada a ocorrência nas amostras de milho armazenado em espigas de ambos os híbridos. O total de aflatoxinas ($B_1+B_2+G_1+G_2$) encontrado variou de 3,03 a 197,51 $\mu\text{g kg}^{-1}$. E, ainda, todas as amostras (37) do híbrido de milho 2B688RR nas quais foi detectada a presença de aflatoxinas, continham níveis acima do LMT (20 $\mu\text{g kg}^{-1}$), enquanto no híbrido de milho 30K73Hx isso ocorre apenas em 4 amostras.

5.3 Principais aspectos entre os experimentos de armazenagem

Ao se observar os resultados dos parâmetros qualitativos e quantitativos dos grãos de milho, a incidência de fungos (*Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp.) e a ocorrência de aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) nos dois experimentos de armazenagem (de

inverno e de verão), cujos resultados foram apresentados acima, nos itens 5.1 e 5.2, pode-se inferir que houve diferenças entre eles, mas também semelhanças.

As diferentes condições climáticas registradas durante os experimentos, expostas na Figura 22, podem ter sido as responsáveis por boa parte das diferenças obtidas entre os experimentos. Nessa Figura é possível perceber um comportamento inverso tanto da temperatura do ar quanto da UR, durante os 12 meses de armazenagem. Primeiro porque o armazenamento de inverno iniciou e terminou no inverno (jul/2012 a jul/2013), ao passo que o armazenamento de verão iniciou e terminou no verão (fev/2013 a fev/2014).

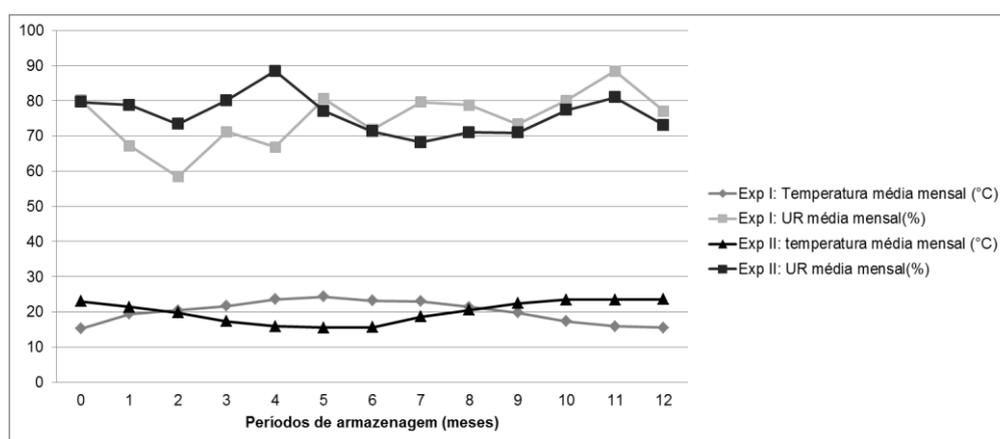


Figura 22 Condições climáticas (temperatura média mensal (°C) e umidade relativa do ar (UR) média mensal(%)) durante os 12 meses de armazenagem para os dois experimentos. Exp I: Armazenamento safra de inverno (jul/2012 a jul/2013); Exp II: Armazenamento safra de verão (fev/2013 a fev/2014).

Fonte: Dados da estação meteorológica automática do INMET (<http://www.inmet.gov.br>).

Em relação ao teor de água dos grãos, verifica-se em ambos os experimentos semelhança no comportamento desse atributo nos acondicionamentos em bolsas herméticas e silo, em que o primeiro acondicionamento apresentou redução e os menores níveis, enquanto o segundo apresentou uma tendência de aumento durante a armazenagem. Os demais acondicionamentos tiveram comportamentos distintos. No armazenamento de inverno, os grãos dos acondicionamentos em sacarias convencionais e espigas, inicialmente, (0-3 meses) reduziram o teor de água e, em seguida, apresentaram aumento progressivo. Já no armazenamento de verão houve aumento até os 6 meses, seguido de progressiva redução. Esse comportamento antagônico entre os experimentos está diretamente relacionado ao comportamento da UR (Figura 22), pois estes tipos de acondicionamentos são mais suscetíveis ao processo de sorção do vapor de água com o ambiente.

Constatou-se aumento do conteúdo de cinzas dos grãos durante a armazenagem, em ambos os experimentos, independente do híbrido e do tipo de acondicionamento. Não

foi possível constatar semelhanças ou padrão de comportamento para o conteúdo de lipídios dos grãos durante a armazenagem entre os experimentos.

Verificou-se, para ambos os experimentos, que o conteúdo de proteínas dos grãos de milho do híbrido 30k73Hx, foi somente influenciado pelo tempo de armazenagem, decrescendo ao longo do período de armazenagem, exceto aos 12 meses no armazenamento de verão, em que houve pequeno incremento. Não houve variação significativa do conteúdo de proteínas dos grãos do híbrido de milho 2B688RR, em todos os acondicionamentos do armazenamento de verão e também nas sacarias convencionais do armazenamento de inverno, enquanto nos demais acondicionamentos deste experimento houve variabilidade, primeiramente com aumento e secundariamente redução, cujos maiores conteúdos foram obtidos entre 3 e 9 meses de armazenagem. Souza (2011) também constatou variabilidade no conteúdo de proteínas em grãos de milho, tanto entre diferentes cultivares como entre tipos de fertilização (adubação orgânica, adubação mineral e sem adubação) e, ainda, entre safras (2009 e 2010).

A percentagem de grãos sem defeito reduziu durante a armazenagem em todos os acondicionamentos, de ambos os experimentos de armazenagem. Sendo que o milho acondicionado em espigas do híbrido 30K73Hx, do armazenamento de inverno e de ambos os híbridos de milho do armazenamento de verão, apresentou a maior percentagem de grãos sem defeito durante a armazenagem.

Ocorreu redução do peso volumétrico (ou massa específica) dos grãos durante o tempo de armazenagem em ambos os experimentos, independente de híbrido e tipo de acondicionamento. Não houve variabilidade significativa no peso de mil grãos durante a armazenagem, nos acondicionamentos em sacarias convencionais e bolsas herméticas de ambos os híbridos e experimentos e, ainda, no silo do armazenamento de inverno. Já no armazenamento de verão os grãos do silo apresentaram redução aos 12 meses de armazenagem, em ambos os híbridos de milho. Enquanto no milho acondicionado em espigas, o peso de mil grãos foi variável em relação aos tempos, híbridos e experimentos de armazenagem.

O aumento do conteúdo de cinzas dos grãos de milho e a redução dos parâmetros percentagem de grãos sem defeito e peso volumétrico, em ambos os experimentos, confirmam o aumento da deterioração dos grãos, durante a armazenagem, independente do tipo de acondicionamento e do híbrido de milho. Embora seja um processo natural, as condições de armazenagem possibilitam a aceleração da deterioração e, neste caso, acredita-se que as condições de temperatura do ar e UR tenham sido os principais fatores influentes, uma vez que, os experimentos de armazenagem foram realizados em condições ambientais, sem a utilização de sistemas de aeração ou termometria. Rutz (2012) afirma

que elevadas temperaturas e UR intensificam a velocidade de deterioração dos grãos durante a armazenagem, o que é corroborado neste experimento.

Percebe-se disparidade da microbiota fúngica dos grãos entre os experimentos, principalmente em relação à ocorrência do gênero *Aspergillus*, cuja presença nos grãos de milho do armazenamento de inverno foi somente detectada a partir dos 3 meses de armazenagem (out/2013) e em apenas 22 amostras, enquanto no armazenamento de verão foi verificada desde a colheita, ao todo em 84 amostras. Atribui-se esse fato às condições ambientais da época de colheita, que foram mais propícias ao desenvolvimento desse fungo no armazenamento de verão. Bernd (2006) relaciona o desenvolvimento fúngico da etapa de armazenagem com a carga de esporos presente no meio da massa de grãos desde o cultivo na lavoura. A média de UR do ar registrada na época de colheita do milho utilizado no armazenamento de inverno estava acima de 80%, enquanto na colheita do milho utilizado no armazenamento de verão estava em torno de 70% e a temperatura média era, respectivamente 15,2 °C e 23 °C. Segundo Thompson e Henke (2000), *A. flavus* e *A. parasiticus* podem crescer e produzir aflatoxinas em temperaturas acima de 21 °C e, ainda, Dias (2012) verificou em seu experimento que a UR de 70% apresentou maior incidência de *Aspergillus* sp que a UR 80%.

Apesar de que outros fatores também podem ter contribuído para a maior de contagem de *Aspergillus* sp. no armazenamento de verão, como o local onde os híbridos foram cultivados, pois os dois experimentos foram realizados na microrregião de Dois Vizinhos, os locais foram distintos, além de outros fatores mencionados por Bernd (2006), como as práticas de manejo, a época e a densidade de semeadura, as condições climáticas como estresse hídrico, altos índices de pluviosidade, a infestação por plantas invasoras, a prática de rotação de cultura, a fertilidade do solo, a microbiota do solo e da vegetação de entorno, o tempo entre a maturação fisiológica e a colheita.

Almeida, Correa e Mallozzi (2000), avaliando a microbiota fúngica de 3 híbridos de milho recém-colhidos, oriundos de três regiões do Estado de São Paulo, também não detectaram a presença de *Aspergillus* sp. nas amostras oriundas de Ribeirão Preto, enquanto *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. foram diagnosticados em 77,8 e 50% das amostras. Nas demais regiões (Assis e Capão Bonito), a presença de *Aspergillus* sp. foi verificada ainda na colheita (em 23,3 e 22,22% das amostras). Ramos *et al.* (2008) também encontraram diferenças entre locais de cultivo na incidência de *Aspergillus* sp., encontrando esse gênero fúngico em 100% das amostras de Jataí, 41,7% das amostras de Goiânia e em apenas uma de Montividiu.

A incidência de *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. foi verificada, respectivamente, em 20,37, 86,11 e 94,4% das amostras do armazenamento de inverno e

em 83,29, 91,62 e 90,07% das amostras do armazenamento de verão. Os resultados de incidência fúngica encontrados por Bento (2011) diferiram entre as safras 2009 e 2010. Na primeira, a incidência de *Fusarium* sp. variou de 25,3 a 58,3% e, na segunda, de 23,16 a 94,16%. Ao contrário de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. que tiveram maior incidência na primeira safra, o *Aspergillus* sp. variou de 3,3 a 44,8% (na safra 2009) e de 3,1 a 37% (na safra 2010) e o *Penicillium* sp. de 4,7 a 42,2% (na safra 2009) e de 0,75 a 17,5% (na safra 2010).

Souza (2011) também encontrou diferenças na incidência de fungos das safras 2009 e 2010, encontrando *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp., respectivamente em 83 e 100% das amostras da primeira safra e em 100 e 69% das amostras da segunda safra, enquanto o *Aspergillus* spp. somente foi detectado na safra 2009 em 14,5% das amostras.

Os fatores analisados, tipos de acondicionamentos e tempos de armazenagem, não influenciaram na contagem de *Aspergillus* sp. nos grãos do armazenamento de inverno, para ambos os híbridos de milho. Ao contrário do ocorrido no armazenamento de verão, quando a interação desses fatores foi significativa e o milho acondicionado em espigas, além de não apresentar variabilidade com o tempo de armazenagem, teve a menor contagem ao longo do período, em ambos os híbridos. Já os grãos de milho acondicionados em sacarias convencionais, bolsas herméticas e silo do híbrido 2B688RR aumentaram a contagem aos 3 meses e mantiveram-se até o fim da armazenagem, enquanto no híbrido de milho 30K73Hx os grãos destes acondicionamentos não apresentaram variabilidade significativa durante a armazenagem.

A contagem de *Fusarium* sp. nos grãos do armazenamento de inverno teve somente influência do fator tempo, com redução partir dos 6 meses em ambos os híbridos de milho, fato que também ocorreu desde o início da armazenagem no armazenamento de verão, para os grãos do híbrido de milho 30K73Hx acondicionados em sacarias e silo. Ainda, neste segundo experimento o milho acondicionado em espigas apresentou a menor ocorrência de *Fusarium* sp., durante a armazenagem.

Verificou-se em ambos os experimentos que a contagem de *Penicillium* sp. sempre obteve os maiores valores no milho acondicionado em espigas e que a contagem total de bolores e leveduras nos grãos apresentou tendência de redução durante a armazenagem, cujo período de tempo e nível de redução foi variável entre os híbridos de milho e acondicionamentos de armazenagem.

Resultados semelhantes foram encontrados por Tanaka *et al.* (2001), avaliando a microflora fúngica de sementes de milho armazenado em sacos de papel (kraft) por 12 meses, em ambiente não controlado, temperatura 18-32 °C e UR 65-95%. Os autores não verificaram variabilidade na ocorrência de *Aspergillus* sp. com o tempo de

armazenagem, enquanto a ocorrência de *Fusarium* sp. diminuiu gradativamente e a de *Penicillium* sp. aumentou. Catão *et al.* (2013), avaliando sementes de milho armazenadas em garrafas (PET), verificaram que os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* tiveram aumento de incidência a partir dos 7 meses de armazenagem e *Fusarium* sp. teve redução, mas, apesar disso, a incidência deste último continuou alta ao fim da armazenagem.

A ocorrência de aflatoxinas foi detectada em 15 das 22 amostras pesquisadas no armazenamento de inverno e em 70 das 84 amostras pesquisadas no armazenamento de verão. Os níveis de contaminação ($B_1+B_2+G_1+G_2$) detectados no primeiro experimento variaram de 2,87 a 14,45 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e, no segundo experimento, de 3,03 a 197,51 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Nenhuma das amostras do armazenamento de inverno apresentou contaminação ($B_1+B_2+G_1+G_2$) maior que 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, o que ocorreu no armazenamento de verão com 41 amostras, sendo 37 do híbrido de milho 2B688RR e 4 do híbrido de milho 30k73Hx. Os resultados são análogos aos de ocorrência de *Aspergillus* sp. obtidos nos respectivos experimentos.

A maior ocorrência de aflatoxinas e os níveis mais elevados de contaminação no armazenamento de verão, provavelmente estejam associados à presença do agente produtor *Aspergillus* sp., desde a colheita, às condições ambientais (Figura 22) mais favoráveis ao seu desenvolvimento e à produção desta toxina durante o experimento. O fato deste experimento de armazenagem ter iniciado no verão (fev/2013), com temperatura média de 23 °C, possibilitou a germinação e proliferação dos esporos de *Aspergillus* sp. presentes nos grãos desde a colheita, assim como a imediata produção de aflatoxinas, a qual foi constatada após o processo de secagem.

Bento (2011) também encontrou diferentes níveis de contaminação por aflatoxinas em amostras milho armazenadas nas safras 2009 e 2010. Na primeira safra, 19% das amostras estavam contaminadas, porém, todas com total ($B_1+B_2+G_1+G_2$) inferior a 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$; na segunda safra, 23% das amostras continham aflatoxinas, 60% dessas com níveis superiores ao LMT, sendo que o máximo detectado foi 108,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Marques *et al.* (2009) também verificaram diferenças entre safras agrícolas na incidência de *Aspergillus* sp. e na ocorrência de aflatoxinas em grãos de milho, cultivados em Astorga, região norte do Paraná. Verificaram baixa incidência de *Aspergillus* sp. e não detectaram aflatoxinas nas amostras de colheita da safrinha 2007 (outono/inverno), independente da umidade de colheita, ao inverso do ocorrido com as amostras colhidas na safra de verão 2007/2008, nas quais encontraram alta incidência de *Aspergillus* sp. e detectaram aflatoxinas, já na colheita. Souza (2011) atribuiu às condições climáticas de cultivo, principalmente à temperatura e aos índices pluviométricos, as diferenças obtidas entre as safras 2009 e 2010 na contaminação dos grãos de milho por fumonisinas.

5.4 Análise dos componentes principais (ACP)

Para definir as características de maior influência na qualidade do milho armazenado através da construção de variáveis matemáticas (CPs), que sintetizam a maior variabilidade do conjunto de dados com a menor perda de informação, utilizou-se o critério de Kaiser (1960), pelo qual se descartam os componentes principais (CPs) com autovalores menores que um ($\lambda < 1$). Desse modo, obtém-se para o híbrido de milho 2B688RR do armazenamento safra de inverno (Tabela 27), que os cinco primeiros CPs explicam 75,39% da variação total do conjunto de dados. Já o híbrido de milho 30k73Hx, também desse armazenamento, possui 74,82% da variação total dos seu dados explicada pelos seis primeiros CPs. Enquanto no armazenamento safra de verão, o híbrido de milho 2B688RR possui 77,87% da variabilidade total explicada pelos cinco primeiros CPs e o híbrido de milho 30K73Hx possui 71,17% da sua variabilidade total explicada por apenas quatro CPs.

Com base nesses resultados (Tabela 27), pode-se inferir que a técnica de componentes principais foi efetiva para resumir as catorze características de qualidade, aferidas neste trabalho em milho armazenado, em conjuntos de 4 a 6 CPs por híbrido de milho. Para Hair *et al.* (2009), o objetivo da ACP é condensar a informação contida em um grande conjunto de variáveis (originais) noutro conjunto menor de variáveis (estatísticas), com a mínima perda de informação, sendo útil para analisar a inter-relação destas variáveis.

Segundo Jackson (1980), é característica das CPs que nenhuma combinação linear possa explicar mais as variáveis originais que a CP₁ e, ainda, sempre que ACP partir da matriz de correlações as variáveis não serão influenciadas pela grandeza das suas unidades de medida.

5.4.1 Componentes principais das características de qualidade do híbrido de milho 2B688RR no armazenamento da safra de inverno

O primeiro componente (CP₁) explica 25,09% da variabilidade total do conjunto de dados (Tabela 27). Esse componente, de acordo com os dados da Tabela 28, possui correlação forte com as variáveis: teor de água, conteúdo de lipídios, temperatura e umidade relativa do ar, e correlações de amplitude moderada com os conteúdos de cinzas e proteínas, peso de mil grãos, peso volumétrico, percentagem de grãos sem defeito e contagem de *Penicillium* sp. Esse componente apresenta relação direta entre os parâmetros físicos, teor de água dos grãos e umidade relativa do ar, cuja relação é proporcionada pelas propriedades higroscópicas dos grãos (SILVA *et al.*, 1995), em que o aumento destes

parâmetros, durante a armazenagem, pode acelerar a degradação dos grãos (SILVA, 2005; SOUZA, 2007; LEAL, 2012). Nesse componente também se verifica relação inversa dos parâmetros físicos com parâmetros quantitativos (peso volumétrico, peso de mil grãos e percentagem de grãos sem defeito), qualitativos (conteúdo de lipídios, cinzas, proteínas), físicos (temperatura) e da microflora (contagem de *Penicillium* sp.). Essas inter-relações possuem procedência relatada na literatura (FARONI, 1998; LAZZARI, 1997; DIONELLO *et al.*, 2000), pois o teor de água dos grãos e a UR estão entre os principais fatores que afetam a qualidade de grãos armazenados.

O segundo componente (CP₂), que explica 19,48% da variabilidade total do conjunto de dados (Tabela 27), possui correlação linear forte com o conteúdo de cinzas e a percentagem de grãos sem defeito, e relação moderada com o conteúdo de proteínas, peso volumétrico, contagem de *Fusarium* sp. e total de bolores e leveduras (Tabela 28). De modo que a temperatura do ar, os conteúdos de cinzas e proteínas correlacionam-se positivamente entre si e, inversamente, com a percentagem de grãos sem defeito, peso volumétrico, contagem de *Fusarium* sp. e total de bolores e leveduras. Assim como aumentos no teor de água dos grãos e na UR, a elevação da temperatura é um dos fatores que mais contribuem para a degradação da massa de grãos durante a armazenagem, ocasionando aumento no conteúdo de cinzas e proteínas (REED *et al.*, 2007) e, conseqüente, redução no peso volumétrico e na percentagem de grãos sem defeito. A correlação inversa da contagem de *Fusarium* sp. e total de bolores e leveduras com a temperatura, está relacionada aos registros de desenvolvimento desse gênero e de outros em temperaturas de 2,5 a 37,5 °C (SILVA, 2007b), ou seja, em uma faixa bem variável. A correlação direta desses fungos com a percentagem de grãos sem defeito e com o peso volumétrico, reforça o fato de que grãos assintomáticos também são acometidos por fungos (MARCONDES, 2012). Hoeltz (2005) também verificou correlação positiva ($r = 0,69$) entre o teor de água dos grãos de arroz armazenado com as contaminações fúngicas.

O terceiro componente (CP₃), que explica 11,76% da variabilidade total do conjunto de dados (Tabela 27), possui apenas correlação linear forte com a contagem de *Penicillium* sp. e moderada com os conteúdos de lipídios e proteínas, peso de mil grãos, teor de água, contagem de *Fusarium* sp. e total de bolores e leveduras (Tabela 28). Havendo correlação positiva entre o conteúdo de lipídios e o peso de mil grãos e inversa destes com o teor de água, conteúdo de proteínas, contagem de *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. e total de bolores e leveduras. As inter-relações verificadas têm coerência, pois a manutenção do teor de lipídios nos grãos durante a armazenagem está relacionada à manutenção da qualidade da massa de grãos, logo, ao peso destes. A redução desses dois atributos está ligada à deterioração, ocasionada pelo aumento do teor de água e das contaminações por fungos e leveduras,

diante disso, o conteúdo de proteínas detectado nas análises tende a aumentar, pois são juntamente quantificadas as proteínas fúngicas (FERRARI FILHO, 2011). Bernd (2006) também verificou relação direta do teor de água dos grãos com a contagem de *Penicillium* sp. e total de bolores e leveduras.

O quarto componente (CP₄), que explica 10,04% da variabilidade total do conjunto de dados (Tabela 27), possui apenas correlação linear forte com a contagem de *Aspergillus* sp. e correlação moderada com a ocorrência de aflatoxinas, com a contagem de *Fusarium* sp. e com o total de bolores e leveduras (Tabela 28). Todas essas variáveis correlacionam-se positivamente, indicando que aumento de uma é proporcional ao aumento das outras ou vice-versa. A correlação positiva entre *Aspergillus* sp. com a ocorrência de aflatoxinas e a contagem de *Fusarium* sp. corrobora os resultados obtidos por Abbas *et al.* (2006), que assinalam que a alta incidência de *Fusarium* sp. parece não inibir a produção de aflatoxinas. Tédihou *et al.* (2012) também encontraram correlação positiva entre a ocorrência de *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. e aflatoxinas.

O quinto componente (CP₅), que explica 9,02% da variabilidade total do conjunto de dados (Tabela 27), apresenta somente as correlações de magnitude moderada a fraca com as características de qualidade do milho (Tabela 28), cuja inter-relação das maiores correlações é positiva entre peso volumétrico, percentagem de grãos sem defeito, contagem de *Aspergillus* sp. e ocorrência de aflatoxinas, e negativa com o conteúdo de lipídios e contagem de *Fusarium* sp. Dada à independência das CPs, de modo que os resultados destas não são correlacionados à CP₅, além de possuir somente correlações moderadas, possui menor representatividade na variabilidade total dos dados em relação à CP₁, CP₂, CP₃ e CP₄. Destaca-se apenas a correlação direta dos parâmetros quantitativos (peso volumétrico e percentagem de grãos sem defeito) com a contagem de *Aspergillus* sp. e a ocorrência de aflatoxinas, que reforçam o fato de que grãos aparentemente sadios podem estar contaminados por fungos e aflatoxinas, resultados obtidos por Farias *et al.* (2000) apoiam essa pressuposição.

De forma geral, pode se inferir que as características de maior correlação com a qualidade dos grãos do milho híbrido 2B688RR, durante a armazenagem, foram a umidade relativa do ar ($r = 0,81$; CP₁), a temperatura ($r = -0,78$; CP₁), o teor de água dos grãos ($r = 0,68$; CP₁), a percentagem de grãos sem defeito ($r = -0,67$; CP₂), o conteúdo de cinzas ($r = 0,65$; CP₂), a contagem de *Penicillium* sp. ($r = -0,65$; CP₃) e de *Aspergillus* sp. ($r = 0,65$; CP₄), pois estas sete características apresentaram forte correlação com os escores das cinco CPs que explicam a maior variabilidade do conjunto de dados.

Tabela 27 Componentes principais (CP), autovalores ($\lambda_i^{(1)}$), proporção da variância explicada por cada componente e acumulada, para cada híbrido de milho (2B688RR e 30K73Hx) nos dois experimentos de armazenagem (safra de inverno e safra de verão)

Componentes da variância	Componentes principais													
	CP ₁	CP ₂	CP ₃	CP ₄	CP ₅	CP ₆	CP ₇	CP ₈	CP ₉	CP ₁₀	CP ₁₁	CP ₁₂	CP ₁₃	CP ₁₄
Armazenamento safra de inverno: híbrido 2B688RR														
Autovalores (λ_i)	3,51	2,73	1,65	1,41	1,26	0,83	0,66	0,57	0,51	0,32	0,28	0,14	0,10	0,04
Proporção (%)	25,09	19,48	11,76	10,04	9,02	5,92	4,69	4,08	3,67	2,31	1,98	0,97	0,70	0,28
Proporção acumulada (%)	25,09	44,57	56,33	66,37	75,39	81,32	86	90,09	93,77	96,07	98,05	99,02	99,72	100
Armazenamento safra de inverno: híbrido 30K73Hx														
Autovalores (λ_i)	2,76	2,18	1,88	1,33	1,25	1,07	0,87	0,84	0,50	0,48	0,34	0,27	0,13	0,09
Proporção (%)	19,74	15,61	13,40	9,51	8,93	7,63	6,21	5,99	3,59	3,40	2,42	1,92	0,95	0,68
Proporção acumulada (%)	19,74	35,35	48,76	58,26	67,19	74,82	81,03	87,02	90,62	94,02	96,44	98,36	99,32	100
Armazenamento safra de verão: híbrido 2B688RR														
Autovalores (λ_i)	3,80	2,29	2,18	1,40	1,23	0,89	0,68	0,40	0,31	0,26	0,21	0,18	0,09	0,06
Proporção (%)	27,13	16,39	15,59	9,99	8,76	6,39	4,88	2,88	2,22	1,90	1,50	1,27	0,63	0,45
Proporção acumulada (%)	27,13	43,51	59,11	69,10	77,87	84,26	89,14	92,03	94,25	96,15	97,65	98,92	99,55	100
Armazenamento safra de verão: híbrido 30K73Hx														
Autovalores (λ_i)	4,18	2,56	1,79	1,43	0,97	0,78	0,74	0,47	0,35	0,25	0,20	0,14	0,11	0,02
Proporção (%)	29,89	18,30	12,77	10,21	6,91	5,61	5,26	3,39	2,53	1,77	1,43	1,03	0,76	0,16
Proporção acumulada (%)	29,89	48,18	60,95	71,17	78,08	83,69	88,94	92,33	94,86	96,63	98,06	99,09	99,84	100

⁽¹⁾ $i = 1, 2, 3, \dots, 14.$

5.4.2 Componentes principais das características de qualidade do híbrido de milho 30K73Hx no armazenamento da safra de inverno

São seis os CPs que explicam a maior parte da variabilidade dos dados de qualidade do milho do híbrido 30k73Hx (Tabela 27), sendo que o primeiro componente (CP₁) explica 19,74% desta variabilidade. De acordo com os dados da Tabela 28, esse componente possui correlação forte com as variáveis: percentagem de grãos sem defeito, peso volumétrico e temperatura, sendo que as duas primeiras possuem correlação positiva entre si e inversa com a temperatura. Essa inter-relação já era esperada, pois aumentos na temperatura aceleram a taxa respiratória de grãos e microrganismos associados, causando perda de massa e maior deterioração (PARAGINSKI, 2013). Essa componente também apresenta correlações moderadas positivas entre o conteúdo de proteínas, umidade relativa do ar, contagem de *Penicillium* sp. e total de bolores e leveduras e negativas com o peso de mil grãos e ocorrência de aflatoxinas. Leal (2012) também verificou correlação negativa entre matéria seca e grãos fungados. Segundo Dale e Jackson (1994), grãos com baixa densidade (peso volumétrico ou massa específica) apresentam maior conteúdo de proteína bruta.

O segundo componente (CP₂) que explica 15,61% da variabilidade total do conjunto de dados (Tabela 27), possui correlação linear forte com o peso volumétrico dos grãos, conteúdo de lipídios e umidade relativa do ar; correlação moderada com a temperatura, teor de água dos grãos e contagem de *Aspergillus* sp. (Tabela 28). Sendo que a umidade relativa do ar e o teor de água dos grãos se correlacionam positivamente entre si e negativamente com o conteúdo de lipídios e o peso volumétrico. Conforme já relatado, o aumento dos fatores físicos (teor de água e UR) na armazenagem provoca aceleração no metabolismo dos grãos com conseqüente consumo dos recursos energéticos, causando a degradação dos lipídios e a perda de massa. Para Deliberali *et al.* (2010), o conteúdo de lipídios é o constituinte químico do grão mais propenso à deterioração, durante o período de armazenagem. O grau de degradação lipídica é indicador de conservabilidade dos grãos. Estes dois fatores físicos: teor de água e UR também se correlacionam negativamente com a temperatura e a contagem de *Aspergillus* sp. Em relação à temperatura, verifica-se na Figura 22 comportamento inverso em relação à UR, durante o período de armazenagem, cujas maiores umidades relativas do ar ocorreram durante o inverno (menores temperaturas) e as menores UR no verão (maiores temperaturas). A correlação inversa com *Aspergillus* sp. advém do fato de esse gênero ser classificado como fungo de armazenagem, por se desenvolver melhor em grãos com baixo teor de água (em torno de 13%) e em umidades relativas do ar na faixa de 70% (DIAS, 2012).

O terceiro componente (CP₃), que explica 15,61% da variabilidade total do conjunto de dados (Tabela 27), possui correlação linear forte positiva com o teor de água dos grãos e negativa com o peso de mil grãos e correlações moderadas positivas com a contagem de *Aspergillus* sp. e ocorrência de aflatoxinas e negativas com a contagem total de bolores e leveduras (Tabela 28). O teor de água, a contagem de *Aspergillus* sp. e a ocorrência de aflatoxinas possuem correlação positiva entre si e negativa com o peso de mil grãos e a contagem total de bolores e leveduras. Como o teor de água dos grãos, durante a armazenagem, teve como média 12,1% (variando de 10,9 a 13,53%), níveis que foram favoráveis à ocorrência de *Aspergillus* sp. e aflatoxinas, fica evidente a relação positiva entre esses fatores. Para Farias *et al.* (2000) e Veit (2013), embora a presença do fungo (*Aspergillus* sp.) com potencial toxigênico nos grãos não garanta a sua contaminação por aflatoxinas, essa é um indicativo e representa um risco potencial. Já a correlação inversa das características teor de água, contagem de *Aspergillus* sp. e a ocorrência de aflatoxinas com a contagem total de bolores e leveduras pode ser atribuída à competição entre espécies, dado que a dominância de determinada espécie é influenciada pelas condições climáticas e pelo tipo de substrato, de forma que a espécie predominante pode tanto inibir as outras, como reduzir ou provocar a produção de metabólitos tóxicos, tais como as aflatoxinas. Para Dias (2012), condições de estresse favorecem à produção de micotoxinas por fungos.

O quarto componente (CP₄) explica 9,51% da variabilidade total do conjunto de dados (Tabela 27) e possui apenas correlações moderadas a fracas (Tabela 28), sendo que a temperatura e a contagem de *Fusarium* sp. possuem correlação positiva entre si e negativa com os conteúdos de cinzas e lipídios, umidade relativa do ar, ocorrência de aflatoxinas e contagem total de bolores e leveduras, os quais se inter-relacionam positivamente. Bernd (2010) também encontrou correlação positiva entre o conteúdo de cinzas e de lipídios ($r = 0,70$). Orsi *et al.* (2000) encontraram correlação negativa da contaminação por *Fusarium* sp. com a umidade relativa do ar, mas, ao inverso desta componente, também obtiveram relação negativa desse fungo com a temperatura. A inter-relação direta obtida para o conteúdo de cinzas e a ocorrência de aflatoxinas, contrariam os resultados de Salemullah *et al.* (2006), que encontraram correlação inversa ($r = - 0,50$) e de Bernd (2010), que não obteve correlação significativa.

O quinto componente (CP₅) explica 8,93% da variabilidade total do conjunto de dados (Tabela 27) e, também, possui apenas correlações moderadas a fracas (Tabela 28), cujas inter-relações são diretamente proporcionais entre conteúdo de cinzas, peso volumétrico e contagem de *Penicillium* sp. e inversas com o conteúdo de proteínas, contagem de *Aspergillus* e de *Fusarium* sp. Embora estas relações sejam moderadas, dão

indícios de que o aumento da ocorrência dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* provoca perda de massa e aumento do conteúdo de proteínas nos grãos, uma vez que os fungos consomem principalmente o gérmen do grão, devido à alta constituição lipídica (energética), fato que contribui para o aumento da proporção de proteínas nos grãos em relação ao total de matéria seca (ANTUNES *et al.*, 2011). Essa inter-relação sugere competição entre estes dois gêneros com o *Penicillium* sp. Marin *et al.* (1998c), avaliando as competições entre as espécies fúngicas que mais acometem milho, constataram dominância do gênero *Penicillium* sp. em algumas condições ambientais. Leal (2012) também verificou correlações negativas do conteúdo de proteínas dos grãos com o peso volumétrico. Para Bernd (2010), o conteúdo de proteínas correlacionou-se positivamente com a ocorrência de *Fusarium* sp. ($r = 0,31$) e negativamente com a ocorrência de *Aspergillus* sp. ($r = -0,36$), enquanto o conteúdo de cinzas correlacionou-se positivamente com o de proteínas ($r = 0,57$) e não teve correlação significativa com a incidência fúngica.

O sexto componente (CP₆), que explica 7,63% da variabilidade total do conjunto de dados (Tabela 27), também possui apenas correlações moderadas a fracas (Tabela 28), com inter-relações positivas entre conteúdo de lipídios, percentagem de grãos sem defeito, peso de mil grãos e ocorrência de aflatoxinas e negativas com o conteúdo de cinzas. Apesar da magnitude das inter-relações ser moderada, estas nos dão indicativo de que a contaminação por aflatoxinas, além de ocorrer em grãos assintomáticos, não provoca aumento na sua deterioração, pois se verifica correlação positiva com a percentagem de grãos sem defeito e com o peso de mil grãos e negativa com o conteúdo de cinzas. Saleemullah *et al.* (2006) também encontraram correlação negativa ($r = -0,50$) entre a ocorrência de aflatoxinas e o conteúdo de cinzas. Já a correlação positiva da ocorrência de aflatoxinas com o conteúdo lipídios apresenta controvérsias. Silva (2007a) descreve que na produção das aflatoxinas ocorre a hidrólise lipídica, na qual são produzidos os ácidos graxos, os quais são assimilados pelos fungos para sintetização das aflatoxinas.

De forma geral, pode se inferir que as características de maior correlação com a qualidade dos grãos de milho do híbrido 30K73Hx, durante a armazenagem, foram percentagem de grãos sem defeito ($r = 0,71$; CP₁), peso de mil grãos ($r = -0,70$; CP₃), temperatura do ar ($r = -0,63$; CP₁), umidade relativa do ar ($r = -0,63$; CP₂), conteúdo de lipídios ($r = 0,61$; CP₂), peso volumétrico ($r = 0,61$; CP₁; CP₂), teor de água dos grãos ($r = 0,60$; CP₃), pois estas sete características apresentaram forte correlação com os escores das seis CPs que explicam a maior variabilidade do conjunto de dados.

Tabela 28 Coeficientes de correlação dos componentes principais (CPs que possuem $\lambda \geq 1$) com as catorze características de qualidade dos híbridos milho (2B688RR e 30K73Hx), durante os armazenamentos safra de inverno e safra de verão

Características	Híbrido 2B688RR					Híbrido 30K73Hx					
	Correlação com os componentes principais										
	CP ₁	CP ₂	CP ₃	CP ₄	CP ₅	CP ₁	CP ₂	CP ₃	CP ₄	CP ₅	CP ₆
Armazenamento safra de inverno											
Teor de água	0,68	0,08	-0,43	0,14	0,09	0,22	-0,52	0,60	0,27	-0,22	0,08
Cinzas	-0,48	0,65	-0,10	-0,15	-0,18	-0,52	0,08	0,18	-0,30	0,40	-0,55
Proteínas	-0,49	0,57	-0,45	-0,03	0,07	0,43	0,25	0,11	0,01	-0,52	-0,14
Lipídios	-0,66	-0,20	0,35	0,23	-0,35	-0,08	0,61	0,02	-0,50	-0,12	0,31
Grãos sem defeito	-0,39	-0,67	0,09	-0,22	0,32	0,71	0,26	0,19	0,26	0,26	0,31
Peso mil grãos	-0,59	-0,22	0,42	-0,25	-0,06	-0,39	-0,22	-0,70	-0,09	-0,06	0,34
Peso volumétrico	-0,33	-0,55	-0,03	-0,26	0,59	0,61	0,60	0,07	0,03	0,35	-0,09
Contagem de <i>Penicillium</i> sp.	-0,36	0,09	-0,65	-0,20	0,23	0,47	-0,07	-0,04	-0,15	0,30	0,25
Contagem de <i>Aspergillus</i> sp.	0,02	0,26	0,24	0,65	0,38	-0,12	0,40	0,59	-0,25	-0,30	-0,01
Contagem de <i>Fusarium</i> sp.	-0,24	-0,54	-0,37	0,45	-0,41	0,03	0,28	-0,24	0,33	-0,52	-0,28
Contagem total de bolores e leveduras	-0,09	-0,76	-0,45	0,36	-0,05	0,56	0,21	-0,49	-0,44	-0,13	-0,26
Aflatoxinas (B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂)	-0,28	0,24	0,23	0,56	0,48	-0,31	-0,09	0,41	-0,46	-0,18	0,36
Temperatura do ar	-0,78	0,37	-0,28	0,06	0,12	-0,63	0,55	0,25	0,33	0,23	-0,02
Umidade relativa do ar	0,81	-0,01	0,00	-0,11	0,17	0,43	-0,63	0,25	-0,37	0,09	-0,29
Armazenamento safra de verão											
Teor de água	-0,58	-0,13	0,18	-0,45	0,16	-0,33	-0,41	0,26	-0,71		
Cinzas	-0,87	-0,06	-0,16	0,22	-0,02	-0,70	-0,33	0,02	0,30		
Proteínas	-0,65	-0,26	-0,10	0,10	0,23	0,19	-0,85	0,01	-0,01		
Lipídios	-0,60	0,18	-0,58	0,31	-0,02	-0,79	-0,03	0,24	0,06		
Grãos sem defeito	0,69	-0,06	-0,54	-0,05	0,31	0,51	-0,63	0,14	-0,07		
Peso mil grãos	0,33	0,20	-0,01	0,31	-0,72	0,01	-0,24	0,67	0,29		
Peso volumétrico	0,87	0,05	-0,29	0,18	0,07	0,70	-0,39	-0,14	0,35		
Contagem de <i>Penicillium</i> sp.	-0,02	-0,32	-0,79	-0,26	0,04	0,58	0,01	0,61	0,15		
Contagem de <i>Aspergillus</i> sp.	-0,35	-0,42	0,22	-0,43	-0,32	0,26	0,45	0,34	0,55		
Contagem de <i>Fusarium</i> sp.	0,16	-0,86	0,14	0,34	-0,04	0,78	0,29	-0,15	-0,22		
Contagem total de bolores e leveduras	0,15	-0,90	-0,18	0,20	0,14	0,89	0,28	-0,03	-0,16		
Aflatoxinas (B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂)	0,03	-0,25	0,69	0,50	0,16	-0,07	0,68	0,07	-0,24		
Temperatura do ar	-0,01	0,44	0,27	0,16	0,61	0,04	-0,24	-0,81	0,31		
Umidade relativa do ar	0,62	-0,20	0,36	-0,48	0,06	0,60	-0,27	0,07	-0,23		

5.4.3 Componentes principais das características de qualidade do híbrido de milho 2B688RR no armazenamento da safra de verão

Verifica-se na Tabela 27, que cinco CPs explicam a maior parte da variabilidade dos dados de qualidade do milho do híbrido 2B688RR (armazenamento de verão), sendo que o primeiro componente (CP₁) explica 27,13% dessa variabilidade. Esse componente possui correlações fortes positivas com o percentual de grãos sem defeito, peso volumétrico e umidade relativa do ar, enquanto correlações fortes negativas com os conteúdos de cinzas, proteínas e lipídios (Tabela 28). Também possui correlações de magnitude média positiva com o peso de mil grãos e negativa com o teor de água e a contagem de *Aspergillus*. Percebe-se que ocorrem inter-relações negativas entre os parâmetros de massa (percentual de grãos sem defeito, peso volumétrico e peso de mil grãos), com os parâmetros químicos (conteúdos de cinzas, proteínas e lipídios), com o teor de água e contagem de *Aspergillus*, indicando que a perda de massa está associada ao aumento de tais parâmetros químicos, do teor de água dos grãos e da ocorrência de *Aspergillus* sp.

Os grãos armazenados são organismos vivos e, devido à interação entre fatores físicos, químicos e biológicos, ficam sujeitos a transformações e deteriorações que podem provocar perdas qualitativas, quantitativas e sanitárias, dentre os fatores que influenciam tais perdas estão a temperatura, umidade relativa do ar, o teor de água dos grãos, a disponibilidade de oxigênio, insetos e microrganismos (PIMENTEL; SANTOS; LORINI, 2011)

O segundo componente (CP₂) que explica 16,39% da variabilidade total do conjunto de dados (Tabela 27), possui correlação linear forte negativa com a contagem de *Fusarium* sp. e total de bolores e leveduras. Ainda, correlações de magnitude moderada positiva com a temperatura e negativa com a contagem de *Penicillium* sp. e de *Aspergillus* sp. (Tabela 28). Embora a contagem de *Fusarium* sp. e total de bolores e leveduras tenham tido o maior efeito sobre essa CP, elas possuem relação positiva com a contagem de *Penicillium* sp. e de *Aspergillus* sp., sendo a temperatura o único parâmetro que apresentou influência contrária à contaminação fúngica.

A correlação negativa entre *Fusarium* sp. e a temperatura média do ar também foi descrita em outras pesquisas (ORSI *et al.*, 2000; RODRIGUEZ-AMAYA; SABINO, 2002). Bento (2011) também encontrou correlação positiva entre a contagem de *Penicillium* sp. e de *Aspergillus* sp. ($r = 0,74$), para ele essa inter-relação ocorre porque ambos os gêneros são classificados como de armazenagem, cujas preferências climáticas são semelhantes. Enquanto Tédihou *et al.* (2012) obtiveram correlação positiva entre a incidência de *Aspergillus flavus* e *Fusarium* sp. ($r = 0,49$).

O terceiro componente (CP₃) que explica 15,59% da variabilidade total do conjunto de dados (Tabela 27), possui correlação linear forte positiva com a ocorrência de aflatoxinas e negativa com a contagem de *Penicillium* sp., também correlações de magnitude moderada positiva com umidade relativa do ar e negativa com o conteúdo de lipídios e a percentagem de grãos sem defeito (Tabela 28). Diante dessas inter-relações pode-se inferir que aumentos na umidade relativa do ar favorecem o aumento da produção de aflatoxinas, havendo com isso maior degradação dos grãos, com redução dos grãos sem defeito e do conteúdo de lipídios. Pereira, Carvalho e Prado (2002) confirmam que a produção de aflatoxina aumenta com acréscimos na umidade relativa do ar.

Saleemullah *et al.* (2006) também constataram redução no conteúdo lipídios em amostras de pipoca e grãos de milho inoculados com aflatoxinas durante armazenagem. Possivelmente, a relação inversa entre a ocorrência de aflatoxinas e a contagem de *Penicillium* sp., ocorra em virtude da competição entre esse gênero e as espécies produtoras da toxina, hipótese que corrobora a pesquisa de Tédihou *et al.* (2012), que obtiveram correlação negativa entre a incidência *Aspergillus flavus* e *Penicillium* sp. ($r = -0,34$) e, também, entre a incidência de *Penicillium* sp. e a ocorrência de aflatoxina B₁ ($r = -0,21$).

O quarto componente (CP₄) que explica 9,99% da variabilidade total do conjunto de dados (Tabela 27), possui somente correlações de magnitude moderada, positivas com o conteúdo de lipídios, peso de mil grãos, contagem de *Fusarium* sp. e ocorrência de aflatoxinas e negativas com o teor de água dos grãos, umidade relativa do ar e contagem de *Aspergillus* sp. (Tabela 28). Indicando que os parâmetros físicos (teor de água dos grãos e umidade relativa do ar) foram favoráveis a ocorrência de *Aspergillus* sp., redução do conteúdo de lipídios e do peso de mil grãos, enquanto adversos à ocorrência de *Fusarium* sp. e à produção de aflatoxinas.

O quinto componente (CP₅) que explica 8,76% da variabilidade total do conjunto de dados (Tabela 27), possui correlação forte positiva com a temperatura e negativa com o peso de mil grãos, possui também correlação de grandeza moderada positiva com percentagem de grãos sem defeito e negativa com a contagem de *Aspergillus* sp. (Tabela 28). Novamente se constata a forte influência da temperatura na degradação dos grãos, considerando-se sua relação inversa com o peso de mil grãos. Para Ferrari Filho (2011), a redução dos grãos sem defeito durante a armazenagem está relacionada aos aumentos da temperatura do ar que favorecem o ataque de insetos e fungos.

A partir destes cinco CPs que representam a maior variabilidade do conjunto de dados, pode-se concluir que 12 (85,71%) das 14 características avaliadas possuem maior influência na qualidade dos grãos de milho do híbrido 2B688RR, durante a armazenagem,

pois estas características tiveram correlação forte com os escores destas CPs. Desse modo, pode-se dizer que apenas o teor de água dos grãos ($r = -0,58$ e $-0,45$, respectivamente com CP₁ e CP₄) e a contagem de *Aspergillus* sp. ($r = -0,42$, $-0,43$ e $-0,32$, respectivamente com CP₂, CP₄ e CP₅) tiveram pouca influência na qualidade dos grãos durante a armazenagem, por apresentarem apenas correlações de magnitude moderada a fraca.

Embora Bento (2011) não tenha verificado influência (correlação) do teor de água dos grãos de milho na contaminação fúngica que, segundo Travaglia (2011), constitui um dos maiores problemas na deterioração de grãos, muitos pesquisadores (SILVA; AFONSO; LACERDA, 1995; LAZZARI, 1997; FARONI, 1998; SILVA, 2008; FERRARI FILHO, 2011; MOHALE *et al.*, 2013; PARAGINSKI, 2013) colocam o teor de água dos grãos de milho como um dos principais fatores a serem controlados em baixos níveis (<13%) durante a armazenagem, para manutenção da qualidade dos grãos. Embora as CPs apontem pouca influência desse parâmetro na qualidade dos grãos de milho do híbrido 2B688RR durante a armazenagem, em vista da relevância relatada na literatura, não se recomenda o descarte desta variável em pesquisas futuras.

Ainda que moderada a fraca, a influência da contagem de *Aspergillus* sp. na qualidade dos grãos milho, segundo a ACP, algumas espécies desse gênero são potencialmente produtoras de aflatoxinas e como a ocorrência desta toxina mostrou-se influente, também não se recomenda o descarte desta variável.

5.4.4 Componentes principais das características de qualidade do híbrido de milho 30K73Hx no armazenamento da safra de verão

Constata-se na Tabela 27, que apenas quatro CPs explicam a maior parte da variabilidade dos dados de qualidade do milho do híbrido 30K73Hx (armazenamento de verão), sendo que o primeiro componente (CP₁) explica 29,89% desta variabilidade. De acordo com dados da Tabela 28, esse componente possui correlações fortes, positivas com o peso volumétrico, umidade relativa do ar, contagem de *Fusarium* sp. e total de bolores e leveduras, enquanto negativas com o conteúdo de cinzas e lipídios. Ainda, correlações moderadas, negativas com o teor de água dos grãos e positivas com a percentagem de grãos sem defeito e contagem de *Penicillium* sp. Diante dessas inter-relações, pode-se inferir que as contaminações por *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e total de bolores e leveduras têm influência negativa no conteúdo de cinzas e lipídios dos grãos. É possível, também, inferir que o aumento na ocorrência desses fungos pode acarretar a redução do teor de água dos grãos. A relação inversa dos parâmetros peso volumétrico e percentagem de grãos sem defeito com o conteúdo de cinzas e teor de água indica que o aumento destes

últimos acarreta a redução dos primeiros. Bernd (2010) também encontrou correlação linear positiva ($r = 0,70$) do conteúdo de cinzas com o conteúdo de lipídios em milho, entretanto, não verificou correlação significativa deste com ocorrência de *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. Já a relação positiva entre peso volumétrico e grãos sem defeito com a incidência total de fungos e com os gêneros *Fusarium* e *Penicillium* reforça a existência de contaminação em grãos aparentemente sadios.

Durante a armazenagem, a influência de fatores físicos (temperatura, UR), químicos (oxigênio disponível) e biológicos (respiração, características do grão, microrganismos, insetos-pragas) propiciam a degradação dos grãos, causando perda de massa (peso volumétrico e grãos sem defeito), pelo consumo de reservas nutritivas (matéria orgânica) com conseqüente transformação destas em matéria mineral e água, aumentando assim o conteúdo de cinzas e o teor de água dos grãos (FARONI *et al.*, 2005 ; SANTOS, 2008). Contudo, Alves (2004) considera que a perda de massa dos grãos causada pela própria respiração, durante a armazenagem, é pequena quando confrontada com as perdas ocasionadas por insetos e fungos.

O segundo componente (CP₂), que explica 18,30% da variabilidade total do conjunto de dados (Tabela 27), possui correlação linear forte positiva com a ocorrência de aflatoxinas e negativa com o conteúdo de proteínas e a percentagem de grãos sem defeito (Tabela 28). Essa componente apresenta correlações moderadas, positiva com a contagem de *Aspergillus* sp. e negativas com teor de água dos grãos, conteúdo de cinzas e peso volumétrico. A relação direta entre o agente produtor *Aspergillus* sp. e a ocorrência de aflatoxinas já era esperada e, também, foi verificada por Tédihou *et al.* (2012). Apesar desses pesquisadores não encontrarem correlação significativa do teor de água com a ocorrência de *Aspergillus* sp., eles também encontraram correlação negativa com a contaminação por aflatoxinas. As inter-relações negativas entre a contaminação por *Aspergillus* sp. e aflatoxinas com o teor de água, componentes químicos (cinzas e proteínas) e quantitativos dos grãos (peso volumétrico e percentagem de grãos sem defeito) indicam que a contaminação por esse fungo é maior em grãos com menor umidade e, ainda, que o aumento nos níveis de contaminação tem relação com a redução destes componentes químicos e de parâmetros quantitativos.

O terceiro componente (CP₃) que explica 12,77% da variabilidade total do conjunto de dados (Tabela 27), possui correlação linear forte positiva com o peso de mil grãos e com a contagem de *Penicillium* sp. e negativa com a temperatura do ar (Tabela 28). Além disso, esse componente possui correlação moderada positiva com a contagem de *Aspergillus* sp. Cabe salientar que a temperatura é a característica de maior influência sobre essa CP. Para Borém *et al.* (2006), a temperatura tem extrema importância no desenvolvimento fúngico,

segundo ele a atividade fúngica decai imediatamente com a redução da temperatura e algumas espécies *Aspergillus* sp. podem aumentar sua população 10 a 20 vezes mais rápido quando a temperatura for de 15 °C para 32 °C.

O quarto componente (CP₄), que explica 10,21% da variabilidade total do conjunto de dados (Tabela 27), possui somente correlação linear forte com o teor de água dos grãos, e correlações de magnitude moderada com o conteúdo de cinzas, peso volumétrico, contagem de *Aspergillus* sp. e temperatura, cuja inter-relação é positiva, e é negativa com o teor de água (Tabela 28). A relação inversa entre o teor de água dos grãos e a temperatura do ar, se dá em virtude dos fenômenos de transferência de calor e massa, em que a elevação da temperatura possibilita transferência do vapor de água dos grãos para o ambiente (FERRARI FILHO, 2011). A proliferação de fungos *Aspergillus* sp. é maior em grãos com menor teor de água (MARQUES *et al.*, 2009), por isso a relação inversa. Lazzari (1997) recomenda que os grãos de milho sejam armazenados com teor de água abaixo de 13%, para ele quanto menor a atividade de água, menores serão as deteriorações qualitativas e quantitativas (perda de massa) sofridas pelos grãos, por isso recomenda que a secagem ocorra imediatamente a colheita e seja eficiente. Leal (2012) encontrou diferentes correlações para o conteúdo de cinzas, negativa com o peso volumétrico e positiva com o teor de água dos grãos.

Diante da análise dos quatro CPs que representam a maior variabilidade do conjunto de dados, pode-se concluir que 13 (92,86%) das 14 características avaliadas tiveram maior importância na qualidade dos grãos de milho do híbrido 30K73Hx durante a armazenagem, pois estas características tiveram correlação forte com os escores destas CPs. Apenas a contagem de *Aspergillus* sp. teve pouca influência na qualidade dos grãos ($r = 0,45, 0,34$ e $0,55$, respectivamente para CP₂, CP₃ e CP₄), entretanto, como a ocorrência de aflatoxinas mostrou-se influente e essa variável é dependente da incidência de *Aspergillus* sp., não se recomenda o descarte da contagem deste gênero fúngico em pesquisas futuras.

5.4.5 Aspectos relevantes entre híbridos e experimentos de armazenagem na qualidade do milho segundo ACP

Constata-se pela ACP que as características percentagem de grãos sem defeito, temperatura e umidade relativa do ar tiveram correlação forte com os CPs dos dois híbridos de milho, em ambos os experimentos de armazenagem. Além dessas características, o teor de água dos grãos também apresentou forte influência na qualidade do milho, de ambos os híbridos analisados, no armazenamento safra de inverno.

Em relação ao armazenamento safra de verão, observa-se pela ACP que dentre as catorze características analisadas, a contagem de *Aspergillus* sp., em ambos os híbridos de milho, e o teor de água dos grãos no híbrido de milho 2B688RR tiveram moderada influência na qualidade dos grãos de milho armazenados, enquanto as outras 12 características apresentaram forte influência.

A ACP aponta indícios da existência de diferenças entre os períodos de armazenagem, uma vez que, no armazenamento safra de inverno, apenas quatro características comuns aos dois híbridos de milho, tiveram forte correlação com os CPs de maior representatividade, enquanto no armazenamento safra de verão isso ocorreu com 12 características. Por conta das fortes correlações das 12 características aferidas com os CPs, no armazenamento safra de verão e, ainda, pelas correlações medianas das outras 2 variáveis, pode-se inferir que as características analisadas de fato possuem importância na qualidade do milho armazenado, sendo aconselhável que estas continuem sendo consideradas em novos estudos.

6 CONCLUSÕES

Considerando os objetivos propostos e os resultados obtidos nesta pesquisa, em ambos os experimentos de armazenamento pode-se concluir que:

- Os grãos de milho acondicionados em bolsas seladas hermeticamente apresentaram o menor teor de água, enquanto o milho acondicionado em silo metálico apresentou tendência de aumento desse parâmetro ao longo do tempo.
- O milho acondicionado em espigas do híbrido 30K73Hx, armazenamento safra de inverno e de ambos os híbridos de milho do armazenamento safra de verão, apresentou a maior percentagem de grãos sem defeito.
- O aumento do conteúdo de cinzas dos grãos e a redução dos parâmetros percentagem de grãos sem defeito e peso volumétrico, independente do híbrido de milho e tipo de acondicionamento, indicam aumento da deterioração dos grãos de milho durante a armazenagem.
- As incidências de *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. foram verificadas, respectivamente em 20,37, 86,11 e 94,44% das amostras de milho, do armazenamento safra de inverno, e em 83,3, 91,6 e 90,07% das amostras do armazenamento safra de verão. O gênero *Aspergillus* foi somente detectado aos 3 meses de armazenagem no primeiro armazenamento, enquanto no segundo desde a colheita. A ocorrência de *Fusarium* sp. tendeu a diminuir durante a armazenagem e a de *Penicillium* sp. foi maior no milho acondicionado em espigas.
- A presença de aflatoxinas no milho foi detectada em 15 amostras do armazenamento safra de inverno, com níveis ($B_1+B_2+G_1+G_2$) de 2,87 a 14,45 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e em 70 amostras do armazenamento safra de verão, em níveis de 3,03 a 197,51 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Nenhuma das amostras do primeiro armazenamento apresentou contaminação acima do limite máximo preconizado pela legislação brasileira (20 $\mu\text{g kg}^{-1}$), enquanto no segundo experimento 41 amostras apresentaram.
- Não houve influência significativa dos tipos de acondicionamento e dos tempos de armazenagem em relação à incidência de *Aspergillus* sp. e à ocorrência de aflatoxinas no milho do armazenamento safra de inverno. Ao oposto do ocorrido no armazenamento safra de verão, em que o milho acondicionado em espigas apresentou a menor contagem de *Aspergillus* sp. e não apresentou contaminação por aflatoxinas.

- As diferenças nas condições climáticas, durante o cultivo dos híbridos de milho (safra de inverno 2012 e safra de verão 2012/2013), e dos períodos de armazenagem, podem ter influenciado a disparidade entre os experimentos de armazenamento na ocorrência de *Aspergillus* sp. e na contaminação por aflatoxinas no milho.
- Todas as catorze características avaliadas neste trabalho, apresentaram significativa importância na qualidade do milho armazenado, segundo a análise multivariada ACP.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como os acondicionamentos avaliados (bolsas convencionais, bolsas herméticas e silos metálicos) consistiam de protótipos menores e não abrangiam escala comercial, sugere-se que outras pesquisas sejam realizadas com modelos de acondicionamentos oferecidos pelo mercado, a fim de averiguar se o volume de grãos envolvido no acondicionamento exerce efeito na qualidade do milho durante o período de armazenagem.

Embora a presença de *Aspergillus* sp. tenha sido relacionada com a ocorrência de aflatoxinas, nem todas as espécies desse gênero são capazes de produzir essa toxina, assim, sugere-se a identificação da espécie e do potencial toxigênico das cepas.

Nesta pesquisa observaram-se indícios de diferenças entre os híbridos de milho, na qualidade físico-química e sanitária dos grãos durante a armazenagem, para examinar essa pressuposição seria interessante avaliar um maior número de híbridos de milho.

Em virtude das perdas qualitativas e quantitativas diagnosticadas no milho armazenado, em ambos os experimentos avaliados, e dos níveis de contaminação por aflatoxinas detectados, principalmente no armazenamento safra de verão, ressalta-se a importância de contínuas pesquisas na área do pós-colheita, em especial no armazenamento em nível de fazenda, de modo a viabilizar alternativas de armazenagem para as propriedades rurais, que possibilitem a melhor manutenção da qualidade físico-química e sanitária do milho armazenado, fomentando assim o desenvolvimento da armazenagem em fazenda no Brasil.

REFERÊNCIAS

ABBAS, H. K.; CARTWRIGHT, R. D.; XIE, W.; SHIER, W. T. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. **Journal Crop Protection**, v. 25, n. 1, p. 1–9, jan. 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Resolução - RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011**, publicada no Diário Oficial da União – Seção 1, nº 37 em 22 de fevereiro de 2011. Disponível em: <http://www.abitrigo.com.br/pdf_legislacao/RESOLUCAO-RDC_N_7_DE_18-02-2011-09.03.201_%20p66_%20e_67.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2013.

ALENCAR, E. R.; FARONI, L. R. D.; FERREIRA, L. G.; COSTA, C. 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, p. 9-18, 2011.

ALMEIDA, A. P.; CORREA, B.; MALLOZZI, M. A. B. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from harvested corn hybrids. **Brasilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 321-326, oct./dec. 2000.

ALVES, W. M. **Perda de matéria seca no armazenamento de milho em diferentes temperaturas**. 2004. 84 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

AMARAL, K. A. S.; MACHINSKI JUNIOR, M. Métodos analíticos para determinação de aflatoxinas em milho e seus derivados. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 24, p. 60-62, ago./set. 2006.

AMARAL, K. A. S.; NASCIMENTO, G. B.; SEKIYAMA, B. L.; JANEIRO, V.; MACHINSKI JR, M. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 336-342, jun. 2006.

ANDREATTA, I. **Estudo meta-analítico das interações produtivas e nutricionais das micotoxinas na alimentação de suínos e frangos de corte**. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

ANTONELLO, L. M.; MUNIZ, M. B.; BRAND, S. C.; VIDAL, M. D.; GARCIA, D.; RIBEIRO, L.; SANTOS, V. Qualidade de sementes de milho armazenadas em diferentes embalagens. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 7, p. 2191-2194, out. 2009.

ANTUNES, L. 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.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 5. ed. Viçosa: UFV, 2011. 601 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. Official Methods of Analysis. **Aflatoxins in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts, and pistachio nuts** (AOAC 991.31). Disponível em: <http://www.graintec.com.au/attachments/download/188/Aflatoxins_MycoSep_Method_AOAC%20994_08.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2012.

ATAYDE, D. D. **Sistemas de rotação de culturas e infecção de grãos de milho por *Fusarium verticillioides* em regiões produtoras no estado de São Paulo**. 2013. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

BARBOSA, L.; LOPES, P. S.; REGAZZI, A. J.; GUIMARÃES, S. E. F.; TORRES, R. A. Avaliação de características de carcaça de suínos utilizando-se a análise dos componentes principais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 6, p. 2209-2217, nov./dez. 2005.

BARNEY, R.; SEDLACEK, J. D.; SIDDIQUI, A.; PRICE, B. Quality of stored corn (maize) as influenced by *Sitophilus zeamais motsch.* and several management practices. **Journal Stored Products Research**, v. 27, n. 4, p. 225-231, oct. 1991.

BENTO, L. F.; CANEPPELE, M. A. B.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; KOBAYASTI, L.; CANEPPELE, C.; ANDRADE P. J. Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 44-49, 2012.

BENTO, L. **Qualidade física e sanitária de grãos de milho armazenados em Mato Grosso**. 2011. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) – Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2011.

BERND, L. P. ***Fusarium verticillioides* e fumonisina na cadeia produtiva de milho: modelagem matemática e estratégia de controle**. 2010, 215 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

BERND, L. P. **Modelagem com ênfase no crescimento de *Fusarium verticillioides* e produção de fumonisinas na perda da qualidade de milho**. 2006, 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

BIBU, K. J. Aflatoxicosis in a white pekin duck. **Veterinary World**, v. 4, n. 5, p. 215-215, 2011.

BITTENCOURT, A. B. F.; OLIVEIRA, C. A. F.; DILKIN, P.; CORRÊA, B. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. **Food Control**, v. 16, n. 2, p. 117–120, feb. 2005.

BORÉM, F. M.; RESENDE, O.; MACHADO, J. C.; FONTENELLE, I. M. R.; SOUZA, F. F. Controle de fungos presentes no ar e em sementes de feijão durante armazenamento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, n. 3, p. 651–659, 2006. v.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 398 p. Disponível em: <<http://www.bs.cca.ufsc.br/publicacoes/regras%20analise%20sementes.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 60, de 22 de dezembro de 2011, que estabelece o regulamento técnico do milho**. Publicada no Diário Oficial da União de 23/12/2011, com alterações dadas pela Instrução Normativa MAPA nº. 18, de 4 de julho de 2012. Disponível em <<http://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=78895>>. Acesso em: 7 abr. 2014.

BRYDEN, W. L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 1-2, p. 134-158, apr. 2012.

BURAGAS, A. **Comportamento alimentar de codornas poedeiras (Coturnix Japonica) recebendo rações com diferentes micotoxinas**. 2005. 66 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Pós-Graduação em Nutrição Animal, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

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

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, jan./fev. 2008.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artemed, 2003. 255 p.

CALONI, F.; CORTINOVIS, C. Toxicological effects of aflatoxins in horses. **The Veterinary Journal**, v. 188, n. 3, p. 270-273, jun. 2011.

CAMARGO, R.; CARVALHO, M. M. Armazenamento a vácuo de semente de milho doce. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 131-139, 2008.

CANÇADO, R. A. **Avaliação microbiológica e micotoxicológica de grãos de milho (*zea mays* linné) e soja (*glycine max.* (linné) merrill) provenientes de cultivo convencional das sementes naturais e geneticamente modificadas**. 2004, 166 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

CANEPPELE, M. A. B.; CANEPPELE, C.; LÁZZARI, F. A.; LÁZZARI, S. M. N. Correlation between the infestation level of *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera, Curculionidae) and quality factors of stored corn, *Zea mays* L. (Poaceae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 47, n. 4, p. 625-630, dez. 2003.

CATÃO, H. C. R. M.; COSTA, F. M., VALADARES, S. V.; MAGALHÃES, H. M.; COSTA, F. M.; SALES, N. L. P.; BRANDÃO JÚNIOR, D. S. Qualidade sanitária de sementes de milho crioulo (*Zea mays* L.) produzidas no município de Porteirinha-MG. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v. 2, n. 2, out. 2007.

CATÃO, H. C. R. M.; COSTA, F. M.; VALADARES, S. V.; DOURADO, E. R.; BRANDÃO JUNIOR, D. S.; SALES, N. L. P. Qualidade física, fisiológica e sanitária de sementes de milho crioulo produzidas no norte de Minas Gerais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 10, p. 2060-2066, out. 2010.

CATÃO, H. C. R. M.; MAGALHÃES, H. M.; SALES, N. L. P.; BRANDÃO JUNIOR, D. S.; ROCHA, F. S. Incidência e viabilidade de sementes crioulas de milho naturalmente infestadas com fungos em pré e pós-armazenamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 5, p. 764-770, mai. 2013.

CECHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas: UNICAMP, 2. ed., 2003, 208 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos - 2014**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_12_10_16_06_56_boletim_portugues_dezembro_2013.pdf> Acesso em: 17 set. 2014.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Panorama do setor de armazenagem no Brasil- 2011**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_tematicas/Infraestrutura_e_logistica/23RO/App_CONAB.pdf> Acesso em: 10 mar. 2014.

CORADI, P. C. **Avaliação de uma fábrica de ração para aves: instalações, processos e produto final**. 2010, 191 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

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 Agronômica**, Fortaleza, v. 41, n. 2, p. 200-207, abr./jun. 2010.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 4. ed. Viçosa: UFV, v. 1, 2012, 514 p.

CRUZ, J. V. S. **Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho e em 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 Zootecnia) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

D'ARCE, M. R. **Pós-colheita e armazenamento de grãos**. São Paulo: ESALQ/USP, p. 1-17. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/Armazenamentodegraos.pdf>>. Acesso em: 7 set. 2011.

DALE, N.; JACKSON, D. True metabolizable energy of corn fractions. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 3, n. 2, p. 179-183, 1994.

DEACON, J. W. **Introduction to modern mycology**. 2. ed. London United Kingdom: Blackwell Sci. Publ., 1984. 238 p.

DELIBERALI, J.; OLIVEIRA, M.; DURIGON, A.; DIAS, A. R. G.; GUTKOSKI, L. C.; ELIAS, M. C. Efeitos de processo de secagem e tempo de armazenamento na qualidade tecnológica de trigo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 5, p. 1285-1292, set./out., 2010.

DERERA, J.; PIXLEY, K. V.; GIGA, D. P.; MAKANDA, I. Resistance of maize to the maize weevil: III. Grain weight loss assessment and implications for breeding. **Journal of Stored Products Research**, v. 59, p. 24–35, oct. 2014.

DIAS, I. E. **Crescimento micelial e produção de toxinas por fungos de armazenamento associados a grãos de milho sob diferentes níveis de restrição hídrica**. 2012, 58 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

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

DIONELLO, R.; RADÚNZ, L.; CONRAD, V. J. D.; LUCCA F^o, O.; ELIAS, M. Temperatura do ar na secagem estacionária e tempo de armazenamento na qualidade de grãos de milho. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 6, n. 2, p. 137-143, mai./ago. 2000.

ECKERT, R. G. **Segurança alimentar de produtos derivados de milho consumidos em Cascavel - Pr**. 2011. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2011.

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**, Brasília, v. 35, n. 3, p. 617-621, mar. 2000.

FARONI, L. R. **Fatores que influenciam a qualidade dos grãos armazenados**. Viçosa: UFV. p. 1-15, 1998. Disponível em: <<https://www.ufv.br/Dea/.../Fatores%20influenc%20qualid%20graos.doc>> Acesso em: 31 mai. 2012.

FARONI, L. R.; ALENCAR, E. R.; PAES, J., COSTA, A.; ROMA, R. C. C. Armazenamento de soja em silos tipo bolsa. **Engenharia Agrícola Jaboticabal**, v. 29, n. 1, p. 91-100, jan./mar. 2009.

FARONI, L. R.; BARBOSA, G. N. O.; SARTORI, M. A.; CARDOSO, F. S.; 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, jul./set. 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 Fitotecnia com Ênfase em Horticultura) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

FERRARI FILHO, E., ANTUNES, L. E. G., GOTARDI, R., DIONELLO, R. G., PETRY, P. A. R.; BARRETO, G. P. Qualidade de grãos de trigo submetidos a diferentes condições de armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 18, n. 1, p. 25-35, 2012.

FERREIRA, P.; QUEIROZ, V. A. V.; CONCEIÇÃO, R. R. P.; MIGUEL, R. A. Incidência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos de milho consumidos no estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 12, n. 1, p. 54-60, 2013.

FIGUEIRA, E. L. Z.; COELHO, A. R.; ONO, E. Y. S.; HIROOKA, E. Y. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 359-378, jul./dez. 2003.

FLEURAT-LESSARD, F. Qualitative reasoning and integrated management of the quality of stored grain: a promising new approach. **Journal of Stored Products Research**, v. 38, n. 2, p. 191-218, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Fungos de armazenagem**. Disponível em: <<http://www.fao.org/wairdocs/x5012o/x5012o01.htm>>. Acesso em: 8 jan. 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Mycotoxin regulations in 2003 and current developments**. 2003. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e07.htm>> Acesso em: 28 ago. 2014

FREIRE; F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. **Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal**. Fortaleza: Embrapa, 2007. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/cd/jss/acervo/Dc_110.pdf>. Acesso em: 8 out. 2013.

FREITAS, E. R.; SAKOMOURA, N. K.; NEME, R.; BARBOSA, N. A. Valor nutricional do milho termicamente processado, usado na ração pré-inicial para frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 4, p. 510-517, ago. 2005.

GUENHA, R.; SALVADOR, B. V.; RICKMAN, J.; GOULAO, L. F.; MUOCHA, I. M.; CARVALHO, M. O. Hermetic storage with plastic sealing to reduce insect infestation and secure paddy seed quality: a powerful strategy for rice farmers in Mozambique. **Journal of Stored Products Research**, p. 1-7, jul. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022474X14000666>>. Acesso em: 5 set. 2014.

HAIR, J. F. J.; BLACK, W. C.; BADIN, B. J., ANDERSON, R. E., TATHAN, R. L. **Análise multivariada de dados**. 6. ed. São Paulo: Bookman, 2009. 688 p.

HAYASHI, L. Anticorpo Monoclonal Anti-B1: **Coluna de imunoafinidade espectrofluorimetria para controle de qualidade de alimentos**. 2007. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

HELL, K., CARDWELL, K. F., SETAMOU, M., POEHLING, H. M. The influence of storage practices on aflatoxina contamination in maize in four agroecological zones of Benin, west Africa. **Journal of Stored Products Research**, v. 36, n. 4, p. 365-382, oct. 2000.

HERMANNNS, G.; PINTO, F. T.; KITAZAWA, S. E.; NOLL, I. B. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 7-10, jan./mar. 2006.

HOELTZ, M. **Estudo da influência de manejos pós-colheita na incidência de fungos e micotoxinas em arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2005, 88 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande Sul, Porto alegre, 2005.

HOELTZ, M.; FAGUNDES, C. A.; ALCAYAGA, E. A. L.; NOLL, I. B. Micobiota e micotoxinas em amostras de arroz coletadas durante o sistema estacionário de secagem e armazenamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 803-808, mai./jun. 2009.

HUSSEIN, S. H.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on human and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, set. 2001.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC. **Some naturally occurring substances**: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: IARC, v. 56, p. 445-446, 1993.

JACKSON, J. E. Principal components and factor analysis: Part I – Principal components. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 201-213, out. 1980.

JAIMEZ, J.; FENTE, C. A.; VAZQUEZ, B. I.; FRANCO, C. M.; CEPEDA, A.; MAHUZIER, G.; PROGNON, P. Review: Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of Chromatography A**, Lugo, Spain, v. 882, n. 1-2, p. 1-10, jun. 2000.

JIN, J.; TANG, L.; HRUSKA, Z.; YAO, H. Classification of toxigenic and atoxigenic strains of *Aspergillus flavus* with hyperspectral imaging. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 69, n. 2 p. 158–164, dec. 2009.

JOLLIFFE, I. T. **Principal Component analysis**. New York: Springer-Verlag, 1986, 271 p.

JOOD, S.; KAPOOR, A.; SINGH, R. Effect of Insect Infestation and Storage on Lipids of Cereal Grains. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 44, n. 6, 1502-1506, jun. 1996.

JORNAL OFICIAL DA UNIÃO EUROPEIA – JOUE. **Regulamento (CE) nº 401/2006**, de 23 de fevereiro de 2006. Estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controle oficial dos teores de micotoxinas nos gêneros alimentícios. Publicado em: 9 mar. 2006. Disponível em: <[http://www.ivegetal.com.br/cvegetal/Legisla%C3%A7%C3%A3o%20Geral/REGULAMENT O%20CE%20No%20401-2006.pdf](http://www.ivegetal.com.br/cvegetal/Legisla%C3%A7%C3%A3o%20Geral/REGULAMENT%20CE%20No%20401-2006.pdf)> Acesso em: 10 ago. 2014.

KAISER, H. F. The application of electronic computers to factor analysis. **Educational and Psychological Measurement**, v. 20, p. 141-151, 1960.

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

KHATTREE, R.; NAIK, D. N. **Multivariate data reduction and discrimination with SAS software**. Cary: SAS Institute, 2000, 574 p.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W.; SCHRECKENBERGER, P.; WINN, W. **Diagnóstico microbiológico** – texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 2001. 1465 p.

LAMBONI, Y.; HELL, K. Propagation of mycotoxigenic fungi in maize stores by post-harvest insects. **Internatinal Journal of Tropical Insect Science**, v. 29, n. 1, p. 31-39, mar. 2009.

LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2. ed. Curitiba: Ed. do Autor, 1997. 148 p.

LEAL, P. C. **Qualidade de grãos de milho em dietas para frangos**. 2012, 99 f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

LEAÑOS, M. L. G.; GÓMEZ, J. A. A.; SÁNCHEZ, J. N.; BAHEZA, E. C.; REYES, J. G. R. Silo hermético para el control de plagas de granos almacenados en guanajuato, México. **Agricultura Técnica en México**, v. 33, n. 3, p. 231-239, sep./dic. 2007.

LEUNG, M. C. K.; DIAZ-LLANO, G.; SMITH, T. K. Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 9623-9635, dec. 2006.

LILLEHOJ, E. B.; KWOLEK, W. F.; GUTHRIE, W. D.; BARRY, D.; MCMILLIAN, W. W.; WIDSTRON, N. W. Aflatoxin accumulation in preharvest maize (*Zea mays* L.) kernels, interactions of 3 fungal species in European corn borer *Ostrinia nubilis* and 2 hybrids. **Plant soil**, v. 65, p. 95-102, 1982.

LINO, C. M.; SILVA, L. J. G.; PENA, A. S. Metodologias analíticas para determinação das fumonisinas em milho e alimentos à base de milho. **Revista Química Nova**, Coimbra, v. 29, n. 2, p-293-299, mar./abr. 2006.

LORINI, I. **Manual técnico para manejo integrado de pragas de grãos de cereais armazenados**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. 80 p. Disponível em: <http://livraria.sct.embrapa.br/liv_resumos/pdf/00071730.pdf> Acesso em: 15 mai. 2014.

MACHINSKI, M.; VALENTE SOARES, L. M.; 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**, Washington, v. 81, p. 1001-1007, 2001.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1-2, p. 131-139, oct. 2007.

MAGAN, N.; HOPE, R.; CAIRNS, V.; ALDRED, D. Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, n. 7, p. 723-730, sep. 2003.

MARCONDES, M. M. **Incidência de podridão de colmo e grãos ardidos em híbridos de milho sob diferentes densidades de plantas e épocas de colheita**. 2012, 76 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2012.

MARIN, S.; COMPANYS, E.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; MAGAN, N. Effect of water activity and temperature on competing abilities of common maize fungi. **Mycological Research**, v. 102, n. 8, p. 959-964, ago. 1998a.

MARIN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; VINAS, I.; MAGAN, N. Environmental factors, in vitro interspecific interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species isolated from maize grain. **Mycological Research** v. 102, n. 7, 831–837, jul. 1998c.

MARIN, S.; SANCHIS, V.; ARNAU, F.; RAMOS, A. J.; MAGAN, N. Colonisation and competitiveness of *Aspergillus* and *Penicillium* species on maize grain in the presence of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 107-117, dec. 1998b.

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

MARTINS, M. K. **Variabilidade genética de isolados *Fusarium* sp. e estudo da interação com a planta hospedeira**. 2005. 124 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MATIOLI, J. C.; ALMEIDA, A. A. Alterações nas características químicas dos grãos de milho causadas pela infestação de *Sitophilus oryzae* (L., 1763): III – Nitrogênio Total e carboidratos. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 4, n. 1, p. 57-68, 1979.

MAZIERO, M. T; BERSOT L. S. Review: Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 12, n. 1, p. 89-99, 2010.

MINAMI, L.; MEIRELLES, P. G.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Fumonisin: efeitos toxicológicos, mecanismo de ação e biomarcadores para avaliação da exposição. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n.3, p. 207-224, jul./set. 2004.

MOHALE, S.; MEDINA, A.; RODRIGUEZ, A.; SULLYOK, M.; MAGAN, N. Mycotoxigenic fungi and mycotoxins associated with stored maize from different regions of Lesotho. **Mycotoxin Research**, v. 29, p. 209-219, 2013.

MONTEIRO, M. C. P. **Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* sp. em solos preservados do cerrado**. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MORENO, E. C. **Microbiota fúngica e micotoxinas em milho cultivado sob diferentes práticas de manejo**. 2008. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

MOTTA, T. P. **Microbiota fúngica e ocorrência de aflatoxina B₁ na dieta de bovinos leiteiros**. 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal Sustentável) – Programa de Pós-Graduação em Produção Animal Sustentável, Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, 2012.

MULUNDA, M. DZOMA, B.; NYIRENDA, M.; BAKUNZI, F. Mycotoxins occurrence in selected staple food in main markets from Lubumbashi, Democratic Republic of Congo. **Journal of Food, Agriculture e Environment**, v. 11, n. 3-4, p. 51-54, 2013.

NAVARRO, R. B. **Sistemas intensivos de produção de leite e segurança alimentar: aflatoxinas e resíduos de organofosforados e carbamatos**. 2011. 73 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2011, 73.

NOGAIM, Q. A. Natural Incidence of Fungi and Mycotoxins on Corn Grains in Ibb (Yemen). **Pakistan Journal of life and Social Science**, v. 10, n. 2, p. 111-115, 2012.

NUNES, J. L. S. Milho e sua importância econômica. **Agrolink online**. Disponível em: <<http://www.agrolink.com.br/culturas/milho/importancia.aspx>>. Acesso em: 7 set. 2011.

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. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 221-225, maio 2010.

OLIVEIRA, C. A. F.; SEBASTIÃO, L. S.; ROSIM, R. E.; FAGUNDES, H.; FERNANDES, A. M. Ocorrência simultânea de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico em rações para vacas leiteiras. **Revista Analytica**, Campinas, v. 24, p. 88-92, ago./set. 2006.

ONO, E. Y. S.; BERND, L. P.; FUJII, S.; RIBEIRO, R. M. R.; HASHIMOTO, E. H.; HIROOKA, E. Y. **Princípios básicos para análise de micotoxinas**. Londrina: UEL, 2007. 72 p.

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

ORSI, R. B.; CORRÊA, B.; POSSI, C. R.; SCHAMMASS, E. A.; NOUEIRA, J. R.; DIAS, S. M. C.; MALOZZI, M. A. B. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research**, v. 36, n. 1, p. 75-87, jan. 2000.

PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. **Circular Técnica**, n. 75, p. 1-6, 2010. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2006/circular/Circ_75.pdf>. Acesso em: 25 out. 2013.

PARAGINSKI, R. T. **Efeitos da temperatura de armazenamento de grãos de milho nos parâmetros de qualidade tecnológica, metabólitos e propriedades do amido**. 2013. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. How will climate change affect mycotoxins in food? **Food Research Internacional**, v. 43, n. 1, p. 1902-1914, ago. 2010.

PEREIRA, C. E. **Interação entre densidade específica do milho e aflatoxinas no desempenho de frangos de corte**. 2009. 57 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. B.CEPPA **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 141-156, jan./jun. 2002.

PIEREZAN, F.; OLIVEIRA FILHO, J. C.; CARMO, P. M.; LUCENA, R. B.; RISSI, D. R.; TOGNI, M.; BARROS, C. S. L. Surto de aflatoxicose em bezerros no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 5, p. 418-422, mai. 2010.

PIMENTA, E. F. **Investigação das condições de crescimento e produção de metabólitos secundários das linhagens de fungos *Penicillium citrinum* e *Penicillium oxalicum***. 2010. 195 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, v. 1, 2010.

PIMENTEL, M. A. G.; SANTOS, J. P. S.; LORINI, I. **Colheita e pós-colheita: pragas de grãos armazenados**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 7. ed, 2011. 11 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistemas de Produção, 1). Disponível: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_7_ed/colpragas.htm>. Acesso em: 14 ago. 2014.

PIMENTEL, M. A. G.; VIEIRA, V. A.; MENDES, S. M.; COSTA, R. V.; ALBERNAZ, W. M. **Recomendações de boas práticas de armazenamento de milho em espiga para agricultura familiar**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011. 11 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 161). Disponível: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/46071/1/circ-161.pdf>>. Acesso em: 12 ago. 2014.

POZZI, C. R.; ARCARO, J. R. P.; ARCARO JÚNIOR, I.; FAGUNDES, H.; CORRÊA, B. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinás. **Ciência Rural**, v. 32, set./out. 2002. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33132526>>. Acesso: 31 out. 2013.

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

QUEIROZ, V. A. V.; SANTOS, J. P.; TIBOLA, C. S.; QUEIROZ, L. R. **Boas práticas e sistema APPCC na fase de pós-colheita de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 28 f (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 122). Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2009/circular/Circ_122.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2014.

QUERALES, P. J. **Caracterização morfológica de *Fusarium* spp. isolados de sementes e associados à podridão do colmo de milho (*Zea mays* L.)**. 2010. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências/Fitopatologia) – Programa de Pós-Graduação em Ciências, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

RAMOS, A. T. M. **Levantamento da microflora de grãos ardidos de milho e avaliação da resistência genética à *Fusarium verticillioides***. 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

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**, v. 38, n. 2, p. 95-102, jun. 2008.

REED, C., DOYUNGAN, S., IOERGER, B., GETCHELL, A. Response of storage molds to different initial moisture contents of maize (corn) stored at 25°C, and effect on respiration rate and nutrient composition. **Journal of Stored Products Research**, v. 43, n. 4, p. 443-458, 2007

REIS, T. A. **Micobiota e ocorrência de micotoxinas em amostras de castanha-do-Brasil provenientes de diferentes estados Brasileiros**. 2013. 215 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ROCHA, L. O.; NAKAI, V. K.; BRAGHINI, R.; REIS, T. A.; KOBASHIGAWA, E.; CORREA, B. Mycoflora and co-occurrence of fumonisins and aflatoxins in freshly harvested corn in different regions of Brazil. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 10, p. 5090-5103, 2009.

ROCHA, L. O. **Distribuição de fungos e micotoxinas em grãos de milho recém colhidos e variabilidade genética das cepas de *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus flavus* isoladas**. 2010. 174 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

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

ROSSETO, C. A.; LIMA, T. M., VIEGAS, E. C.; SILVA, O. F.; BITTENCOURT. Efeito da calagem, da colheita e da secagem na qualidade sanitária de amendoim na seca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 5, p. 567-573, maio. 2003.

ROSSI, C. N. **Avaliação do risco de exposição de frangos de corte e galinhas poedeiras à contaminação natural por fumonisinas e aflatoxinas**. 2011, 125 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RUPOLLO, G.; GUTKOSKI, L. C.; MARINI, L.J.; ELIAS, M. C. Sistemas de armazenamentos hermético e convencional na conservabilidade de grãos de aveia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1715-1722, nov./dez. 2004.

RUTZ, D. **Efeitos da temperatura e do tempo de armazenamento do trigo sobre parâmetros de avaliação da qualidade dos grãos e das farinhas**. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

SAKATA, R. A.; MAIA, S. P. S.; MAIA, J. T. L. S. Ocorrência de aflatoxinas em produtos alimentícios e o desenvolvimento de enfermidades. **Enciclopédia Biosfera Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 7, n. 13, p. 1477-1498, 2011.

SALEEMULLAH, K.; IQBAL, A.; KHALIL, I. A., SHAH, H. Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts. **Food Chemistry**, v. 98, n. 4, p. 699–703, 2006.

SANTIN, E.; MAIORKA, A.; ZANELLA, I.; MAGON, L. Micotoxinas do *Fusarium* spp na avicultura comercial. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 1, p. 185-190, 2001.

SANTIN, J. A.; GUTOKOSKI, L. C.; EICHELBERGER, L.; PORTELLA, J. A.; DURIGON, A. Qualidade microbiológica de grãos de milho armazenados em silos de alambrado e secados com ar natural forçado. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 8, n. 2, p. 131-144, 2009.

SANTOS, G. C. Micobiota contaminante e ocorrência de aflatoxinas em farinha de milho flocada pré-cozida comercializada em diferentes municípios do estado da Bahia. 2008, 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2008.

SANTOS; S. B, MARTINS; FARONI, L. R.; BRITO JUNIOR, V. R. Perda de matéria seca em grãos de milho armazenados em bolsas herméticas. **Ciência Agrônômica**, v. 43, n. 4, p. 674-682, 2012.

SANTURIO, J. M. Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 2, n. 1, abr. 2000.

SCAFF, R. M. C. **Fumonisinhas em derivados de milho comercializados em santa catarina e sua relação com a saúde humana e alterações histopatológicas em fígado de catfish tratados “in vivo” com fumonisinha b₁**. 2003. 106 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

SCHUH, G.; GOTTARDI, R.; FERRARI, E. F; ANTUNES, L. G. E; DIONELLO. R. G. Efeitos de dois métodos de secagem sobre a qualidade físico-química de grãos de milho safrinha-RS, armazenados por 6 meses. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 235-244, 2011.

SCUSSEL, V. Fungos e Micotoxinas associados a grãos armazenados. In: LORINI, I.; MIIKE, L.; SCUSSEL, V. **Armazenagem de Grãos**. Campinas: IBG, 2002.

SHAH, H.U; SIMPSON, T.J.; ALAM, S.; KHATTAK, K. F.; PERVEEN,S. Mould incidence and mycotoxin contamination in maize kernels from Swat Valley, North West Frontier Province of Pakistan. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 4, p. 1111–1116, Apr. 2010.

SILVA, A. C. S. **Fumonisinhas em produtos de milho: metodologia, análise e avaliação de risco**. 2005. 149 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2005.

SILVA, A. V. A. F. **Ocorrência de aflatoxinas em milho destinado à alimentação de aves no estado da Bahia**. 2007. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007a.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. A new version of the Assistat-Statistical assistance software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4., 2006, Orlando. **Anais: American Society of Agricultural and Biological Engineers**, Orlando-FL-USA, 2006. p. 393-396.

SILVA, J. S. **Secagem e armazenagem de produtos agrícolas**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2008, 560 p.

SILVA, J. S.; AFONSO, A. D. L.; LACERDA FILHO, A. F.; Secagem e armazenagem de produtos agrícolas. In: SILVA, J. de S. (Ed.). **Pré-processamento de produtos agrícolas**. Juiz de Fora: Instituto Maria, p. 395-462, 1995.

SILVA, M. **Avaliação da presença de fungos e micotoxinas na tecnologia de pós-colheita do milho**. 2007. 117 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007b.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 4. ed., São Paulo: Varela, 2010.

SIMIONI, N. R., NÓBREGA, L. H. P.; AFONSO, A. D. L.; ROSA, D. M., MAULI, M. M. Propriedades físicas de grãos de milho e trigo tratadas com terra de diatomáceas. **Revista Varia Scientia Agrárias**, Cascavel, v. 1, n. 2, p. 131-140, 2010.

SINGH, K.; FRISVAD, J. C.; THRANE, U.; MATHUR, S. B. **An illustrated manual on identification of some seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins**. Danish Government, Hellerup, Denmark, 1991.

SOARES, L. V. **Instrumentação para analistas de alimentos e fármacos**. Barueri: Manole, 2006.

SOLEIMANY, F.; JINAP, S.; ABAS, F. Determination of mycotoxins in cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1055-1060, feb. 2012.

SOUZA, A. F. **Estratégias de controle pré e pós-colheita da contaminação por micotoxinas em grãos de milho (*Zea Mays L.*)**. 2011. 128 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

SOUZA, F. R. **Avaliação de diferentes doses de aflatoxina e fumonisina sobre os parâmetros reprodutivos de galos**. 2007. 114 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

STEFANELLO, J.; BACHI, L. M. A., GAVASSONI, W. L.; HIDRATA, L. M.; PONTIM, B. C. A. Incidência de fungos em grãos de milho em função de diferentes épocas de aplicação foliar de fungicida. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 4, p. 476-481, out./dez. 2012.

STELATO, M. M.; CONCON, M. M.; SHIMADA, D.; SREBERNICH, S. M. Contaminação fúngica em barras de cereais comercializadas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, Campinas, v. 69, n. 3, p. 285-290, 2010.

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

TÉDIHOU, E., OLATINWO, R., HELL, K., HAU, B.; HOOGENBOMM, G. Effects of variety, cropping system and soil inoculation with *Aspergillus flavus* on aflatoxin levels during storage of maize. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 37, n. 1, p. 25-36, jan./fev. 2012.

THOMPSON, C., HENKE, S.E. Effect of climate and typ of storage container on aflatoxin production in corn and its associated risks to wildlife species. *Journal of wildlife diseases*, v. 36, n. 1, p. 172-179, 2000.

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) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

UDOH, J. M.; CARDWELL, K. F.; IKOTUN, T. Storage structures and aflatoxin content of maize in five agroecological zones of Nigeria. **Journal of Stored Products Research**, v. 36, n. 2, p. 187-201, 2000.

VEIT, M. **Aflatoxinas em feijão armazenado sob atmosfera modificada.** 2013. 62 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2013.

VIRGILITO, S. B. Estatística Aplicada. 3.ed. São Paulo: Edicon, 2006, 590 p.

VITORINO, O. C. L. **Micotoxinas na alimentação e na saúde animal e humana.** 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Zootécnica) – Departamento de Ciências Agrárias, Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, 2011.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 129-144, apr. 2011.

ZENEON, O., PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (eds). **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 4.ed., 2008, 1020 p.

ZLOTOWSKI, P.; CORRÊA, A. M. R.; ROZZA, D. B.; DRIEMEIER, D.; MALLMANN, C. A.; MIGLIAVACA, F.A. Surto de aflatoxicose em suínos no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 4, p. 207-210, out./dez. 2004.

ZUMMO, N.; SCOTT, G. E. Interaction of *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus flavus* on kernel infection and aflatoxin contamination in maize ears. **Planta Disease**, v. 76, n. 1, p. 771-773, 1992.